

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS EM
AMBIENTES COM ELEVADO NÚMERO DE ANIMAIS E O ESTUDO DE
Ctenocephalides felis felis NO CICLO DE *Leishmania infantum*.**

por

Letícia Gracielle Tôrres de Miranda Estevam

Fevereiro

2023

TESE DCS-IRR

L. G. T. M. ESTEVAM

2023

LETÍCIA GRACIELLE TÔRRES DE MIRANDA ESTEVAM

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS EM
AMBIENTES COM ELEVADO NÚMERO DE ANIMAIS E O ESTUDO DE
Ctenocephalides felis felis NO CICLO DE *Leishmania infantum*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde – área de concentração Transmissores de Patógenos.

Orientação: José Dilermando Andrade Filho

Coorientação: Gustavo Fontes Paz

**Fevereiro
2023**

O presente trabalho foi realizado com apoio de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) - Código de Financiamento 001.

E79I Estevam, Letícia Gracielle Tôrres de Miranda.

2023

Leishmaniose visceral canina: aspectos epidemiológicos em ambientes com elevado número de animais e o estudo de *Ctenocephalides felis felis* no ciclo de *Leishmania infantum* / Letícia Gracielle Tôrres de Miranda Estevam. - Belo Horizonte, 2023.

114 f. : il. color.

Orientador: José Dilermando Andrade Filho.

Coorientador: Gustavo Fontes Paz.

Tese (Doutorado Acadêmico em Ciências da Saúde), Belo Horizonte, 2023.

Bibliografia: f. 86 - 106.

1. Leishmaniose Visceral/epidemiologia. 2. Leishmania infantum/patogenicidade. 3. Ctenocephalides/patogenicidade 4. Infestações por Pulgas/parasitologia. 5. Cães/parasitologia. I. Título.

CDD 616.936 4

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica:
Segemar Oliveira Magalhães – CRB/6 1975 FIOCRUZ. Instituto René Rachou.
Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener

LETÍCIA GRACIELLE TÔRRES DE MIRANDA ESTEVAM

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS EM
AMBIENTES COM ELEVADO NÚMERO DE ANIMAIS E O ESTUDO DE
Ctenocephalides felis felis NO CICLO DE *Leishmania infantum*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde – área de concentração Transmissores de Patógenos.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Dilermando Andrade da Fonseca – IRR/FIOCRUZ Minas (Presidente)

Prof. Dr. Daniel Moreira de Avelar – IRR/FIOCRUZ Minas (Titular)

Prof. Dra. Jacqueline Araújo Fiuza - IRR/FIOCRUZ Minas (Titular)

Prof. Dra. Héliida Andrade Monteiro – ICB-UFMG (Titular)

Prof. Dra. Camila de Valgas e Bastos Castro – Escola de Veterinária/UFMG (Titular)

Prof. Dra. Camila Stefanie Fonseca de Oliveira – Escola de Veterinária/UFMG
(Suplente)

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 10/02/2023.

Dedico este trabalho a todos os animais que fizeram parte deste estudo.

**Para onde quer que vá,
vá com todo seu coração.
Confúcio.**

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ser meu suporte quando as dúvidas e os medos vêm, por ser minha calma quando a ansiedade aparece, por ser o primeiro que agradeço quando as coisas boas acontecem.

Ao José Dilermando por ter me aceitado como sua orientanda e, assim, eu ter a oportunidade de desenvolver este trabalho. Obrigada pela convivência tranquila durante esses anos e por sempre estar disponível e ser sempre solícito em ajudar.

Ao Gustavo Paz pela coorientação durante todo o trabalho e por sempre me incentivar a aprender mais para poder ser uma profissional cada vez melhor. Obrigada pela convivência durante todos esses anos e pela sua amizade.

Aos cães que sem cada um deles esse trabalho não seria possível. Obrigada por nos ensinarem de inúmeras formas e por se doarem tanto por nós.

A todos os funcionários do Centro de Zoonoses da cidade de Sabará que me receberam com um carinho enorme e estavam sempre querendo ajudar, empenhados para que a pesquisa desse certo e sempre entusiasmados sobre os resultados.

Aos motoristas Éder e Divanilde por me levarem em todas as coletas na cidade de Sabará, sempre educados e bem-humorados, fazendo o retorno de um dia cansativo ser mais leve.

Ao Nilson, ao Bruno e à Sheila pela boa acolhida de todos os dias na recepção do Instituto René Rachou.

À Tina por ser a responsável pelos meios de culturas, aprendi e aprendo muito com você. Obrigada pelo seu carinho comigo e pela sua amizade durante todos esses anos de laboratório.

À Anna Luiza Moreira por ter sido uma aluna de iniciação científica tão dedicada e tão prestativa, esses resultados também são seus. Obrigada também por sua amizade e pelo seu carinho.

À Flávia, à Marina e à Thabata pela amizade, pelo carinho e pelo suporte de sempre. Obrigada por sempre terem soluções para os desafios do dia-a-dia e por sempre me ajudarem ao máximo em tudo o que preciso.

Obrigada a todos os membros do Grupo de Estudos em Leishmanioses (GEL) pela convivência durante todo esse tempo. Trabalhar no GEL, fazer parte desse grupo, aprender com cada um, é algo muito valioso e prazeroso.

À Caroline Penido da Plataforma de Sequenciamento do Instituto René Rachou pela paciência e presteza sempre que precisamos de sua ajuda ou de seu trabalho.

À Biblioteca do IRR, em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrando o rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Agradeço aos órgãos de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela concessão da minha bolsa e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto.

Às minhas avós Ozita e Hilda que foram para o lar dos espíritos durante meu doutorado, mas tenho certeza de que de onde estiverem, estão sempre torcendo pela minha felicidade.

Aos meus pais pelo amor e pelo apoio incondicional de sempre. E à minha irmã Fernanda e ao meu cunhado Lucas por sempre torcerem por mim e por sempre estarem prontos quando preciso de ajuda. E à minha prima Paula por ter dividido a casa e a rotina durante uma parte do meu doutorado, obrigada também pela amizade.

À minha sogra Kátia, ao meu sogro Cláudio e aos meus cunhados Vanessa e Éverton, Priscila e Ibrahim, por sempre torcerem por mim.

Ao Breno, meu companheiro, pela amizade e pelo amor em todos os dias e pelo amor e pela paciência nos dias mais pesados. Por todo o apoio e por querer me ver sempre bem e feliz.

À Marie e à Emília, minhas “doguinhas”, por me ensinarem sobre gratidão e por todo dia serem sempre motivo de pelo menos um sorriso meu.

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença de grande relevância para a saúde pública e os humanos têm 90% de chances de vir a óbito se não diagnosticados e tratados. Os cães também são hospedeiros vertebrados que sofrem graves consequências com a doença e, na área urbana, são os principais reservatórios do agente causador da doença, o protozoário *Leishmania infantum*. A proximidade desses animais com os seres humanos nos mostra a importância de se dedicar a pesquisas sobre a tríade epidemiológica - hospedeiros, vetores e ambientes - para que medidas de prevenção e controle mais efetivas sejam tomadas. Além de *L. infantum*, outros patógenos que também podem acometer os cães, como os hemoparasitos *Babesia* spp., *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* devem ser considerados, visto que podem desencadear nos animais uma infecção mais grave quando em conjunto com *L. infantum* e por serem potenciais agentes patogênicos emergentes infectando humanos. Para mais, muito se discute sobre a participação de outros possíveis vetores na LVC a partir de dados encontrados na literatura como em áreas endêmicas existirem muitos cães positivos para *L. infantum* e a taxa de positividade para esses parasitos ser baixa nos flebotomíneos; em alguns locais onde flebotomíneos não foram ainda encontrados, existir cães positivos com infecção autóctone; associações positivas entre infestação de pulgas em cães e a soro conversão desses animais para LV, além de elevado número de cães infestados por pulgas em áreas endêmicas para a doença. Posto isto, pensa-se na hipótese de pulgas participarem de alguma forma do ciclo da LVC. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar sobre a epidemiologia da LV e de hemoparasitoses em cães que habitam em ambientes com elevado número de animais, além disso, investigar a possibilidade da participação de pulgas da espécie *Ctenocephalides felis felis* no ciclo da leishmaniose visceral canina. O trabalho foi realizado em cidades endêmicas para a LVC e situadas no estado de Minas Gerais. Foram utilizados testes sorológicos (DPP e ELISA) para avaliar a taxa de positividade dos cães em abrigos e a técnica de PCR-RFLP para a confirmação da infecção por *L. infantum*. Também foram utilizadas técnicas de biologia molecular para o diagnóstico dos hemoparasitos *Babesia* spp., *E. canis* e *A. platys*. Para a detecção de *L. infantum* em pulgas coletadas de cães de área endêmica para LVC,

foi realizada PCR convencional para o alvo v7v8. *Pools* de pulgas foram submetidos a meios de cultura NNN/LIT para isolar *L. infantum* e, posteriormente, foram utilizadas técnicas de biologia molecular para a identificação do parasito isolado. Dos cães em que foram coletados os espécimes de pulgas foram coletadas amostras de pele para detecção de *L. infantum* através de PCR-RFLP e de isolamento em meio de cultura. Assim, foi encontrada nos cães dos abrigos uma taxa de positividade de 33.6% para *L. infantum*, também foram detectados cães positivos para *Leishmania amazonensis* em amostra de pele, sendo este o primeiro relato. Ainda nos cães dos abrigos foi observado muitos animais coinfectados por *L. infantum* e *Babesia* spp. (36.8%). Em cães com LV de áreas endêmicas, oriundos de residências, observou-se uma taxa de infestação de pulgas *C. felis felis* de 81.9% em cães de Itabirito e de 67.7% em cães de Sabará. Destas pulgas, 12.7% foram positivas para tripanossomatídeos monoxênicos do gênero *Blechnomonas* no alvo v7v8. Foi possível isolar tripanossomatídeos do gênero *Blechnomonas* também das pulgas submetidas ao meio de cultura. Destes cães em que foram coletadas as pulgas, foi isolado *Leishmania guyanensis* de fragmentos de pele submetidos ao meio de cultura NNN/LIT. A partir dos resultados obtidos, sugere-se que mais trabalhos devem ser feitos em abrigos de animais para que medidas mais eficazes de prevenção e controle de doenças transmitidas por vetores possam ser desenvolvidas visando tanto a saúde dos animais quanto a saúde pública. Até o momento, não foi possível constatar evidências da participação de pulgas no ciclo de *L. infantum*, fato importante e, de certa forma, tranquilizador, tendo em vista que a taxa de infestação de cães por pulgas no Brasil é bem elevada. Porém, vale ressaltar que possivelmente reações cruzadas por outros tripanossomatídeos presentes nas pulgas podem ocorrer em testes sorológicos para detecção de *Leishmania* spp. abrindo perspectivas de investigações futuras nesta área. Além disso, a detecção de *L. amazonensis* e de *L. guyanensis* em pele de cães mostra a importância do uso de técnicas moleculares para a identificação da espécie envolvida na infecção e nos traz um alerta de um possível papel do cão como reservatório dessas duas espécies de *Leishmania*.

Palavras-chave: epidemiologia, cães, *Leishmania* spp., hemoparasitos, pulgas, ambiente.

ABSTRACT

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is an important disease to the public health and humans have a 90% chance of death if not diagnosed and treated. Dogs are also hosts that suffer serious consequences from this disease. In urban areas dogs are the main reservoirs of *Leishmania infantum*. The proximity of these animals with humans shows us the importance of more research about the epidemiological triad – hosts, vectors and environment – so that more effective prevention and control measures are taken. Other pathogens can also infect dogs, like the hemopathogens *Babesia* spp., *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys*, and they should be considered, they can initiate a more serious infection when they are together with *L. infantum*. They are also potential emerging pathogens infecting humans. Moreover, it is important to research about other possible vectors of CVL, because there are a lot of positive dogs for *L. infantum* in endemic areas, and the positivity rate of these parasites is low in sand flies; in some places where sand flies were not yet found, there are positive dogs with autochthonous infection; there is a positive association between fleas infestation in dogs and the seroconversion of these animals for CVL, in addition to a high number of dogs infested with fleas in endemic areas for the disease. Thereby, the objective of this study was to investigate the CVL epidemiology and the hemoparasites in dogs from shelters with a high number of animals, furthermore, to investigate the possibility of participation of fleas from the species *Ctenocephalides felis felis* in the CVL cycle. The study was carried out in CVL endemic cities and located in the state of Minas Gerais. Serological tests (DPP and ELISA) were used to evaluate the positivity rates of dogs from shelters and PCR-RFLP was used to confirm the infection by *L. infantum*. Molecular biology techniques were also used to diagnose the hemoparasites *Babesia* spp., *E. canis* and *A. platys*. To detect *L. infantum* in fleas collected from positive dogs to CVL, conventional PCR to the target v7v8 was carried out. Fleas pools were submitted in NNN/LIT culture medium to isolate *L. infantum*, after that, molecular biology techniques were used to identify the pathogen isolated. Skin samples were collected from these dogs to detect *L. infantum* through PCR-RFLP and to isolate in culture medium. The results obtained in the shelters show a 33.6% positivity rate for *L. infantum* in dogs, *Leishmania amazonensis* was also detected in skin samples, this being the first

report of such infection. In these dogs from shelters there was also found a high number of coinfections by *L. infantum* and *Babesia* spp. (36.8%). In dogs with CVL from endemic areas living in households, an infestation rate of 81,9% for *C. felis felis* fleas was detected in the city of Itabirito and 67,7% in the city of Sabara. Of these fleas, 12.7% were positive for monoxenic trypanosomatids of the genus *Blechnomonas* in the target v7v8. *Blechnomonas* sp. was also isolated from fleas submitted in culture medium. Of these dogs from which fleas were collected, *Leishmania guyanensis* was isolated from skin fragments submitted to the NNN/LIT culture medium. From the results obtained, it is suggested that more work should be done in animal shelters and more effective measures for prevention and control of diseases transmitted by vectors can be developed, aiming at both animal health and public health. So far, it has not been possible to find evidence of the participation of fleas in the cycle of *L. infantum*, an important fact and, in a way, reassuring, considering that the rate of infestation of dogs by fleas in Brazil is very high. However, it is worth mentioning that possibly cross-reactions by other trypanosomatids present in fleas may occur in serological tests for the detection of *Leishmania* spp., opening perspectives for future investigations in this area. In addition, the detection of *L. amazonensis* and *L. guyanensis* in dog skin shows the importance of using molecular techniques to identify the species involved in the infection and alerts us to the possible role of the dog as a reservoir for these two *Leishmania* species.

Keywords: epidemiology, dogs, *Leishmania* spp., hemoparasites, fleas, environment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ambiente das residências incluídas no estudo: elevado número de cães.	49
Figura 2 - Gel de Agarose 2% para a o diagnóstico de <i>Leishmania</i> sp. em amostras de medula canina. Para a PCR-RFLP foi utilizado o <i>primer</i> ITS1 e a enzima <i>HaeIII</i>	52
Figura 3 – Cão soro reagente para LV da cidade de Itabirito com sinais clínicos. ...	58
Figura 4 – Cão soro reagente para LV da cidade de Sabará com sinais clínicos. ...	60
Figura 5 – Gel de Agarose a 2% - Amostras de cultura de pele de cães soro reagentes para leishmaniose visceral. PCR-RFLP: Alvo utilizado <i>hsp70</i> e enzima <i>HaeIII</i>	62
Figura 6 – Gel de agarose a 1% com amostras de pulgas retiradas de cães soro reagentes para <i>Leishmania infantum</i> . PCR realizada com o alvo <i>v7v8</i>	63
Figura 7 – Gel de Agarose a 2% - Amostras de cultura de pele de cães soro reagentes para leishmaniose visceral. PCR-RFLP: Alvo utilizado ITS1 e enzima <i>HaeIII</i>	64
Figura 8 – Gel de Agarose a 2% - Amostras de cultura de pele de cães soro reagentes para leishmaniose visceral. PCR-RFLP: Alvo utilizado <i>hsp70</i> e enzima <i>HaeIII</i>	65
Figura 9 – Representação de parte do eletroferograma da sequência da amostra de isolado de tripanossomatídeo de pele de cão em meio de cultura NNN/LIT.....	65
Figura 10 – Tripanossomatídeos isolados de pulgas coletadas de cães soro reagentes para leishmaniose visceral.	66
Figura 11 – Gel de agarose a 1%. Amostra de isolado de pulgas coletadas de cães com leishmaniose visceral. PCR convencional para o alvo <i>v7v8</i>	67
Figura 12 – Gel de agarose a 2%. Amostra de isolado de pulgas coletadas de cães com leishmaniose visceral. PCR-RFLP: alvo <i>hsp70</i> e enzima <i>HaeIII</i>	67

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Frequência de sinais clínicos observados nos 118 cães soro reagentes para leishmaniose visceral canina.....54
- Gráfico 2** – Cães soro reagentes para LVC divididos em dois grupos: 1 – negativos na PCR; 2 – positivos na PCR55
- Gráfico 3** – Manifestações clínicas observadas em cães positivos na PCR-RFLP para *Leishmania amazonensis*, utilizando o alvo ITS1 e a enzima de restrição HaeIII.56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de cães presente em cada residência estudada.....	38
Tabela 2 – Resultados dos testes sorológicos DPP e ELISA – os valores são a soma dos resultados das casas participantes de cada cidade.....	50
Tabela 3 – PCR-RFLP utilizando o alvo ITS1 e a enzima HaeIII.....	53
Tabela 4 – Cães coinfectados com um hemoparasito (<i>Babesia spp.</i> , <i>Ehrlichia canis</i> ou <i>Anaplasma platys</i>) e <i>Leishmania spp.</i>	57
Tabela 5 – Cães coinfectados com dois hemoparasitos (<i>Babesia spp.</i> , <i>Ehrlichia canis</i> ou <i>Anaplasma platys</i>) e <i>Leishmania spp.</i>	58
Tabela 6 – Sinais clínicos observados em cães soro reagentes para LV em Itabirito, Minas Gerais.....	59
Tabela 7 – Sinais clínicos observados em cães soro reagentes para LV em Sabará, Minas Gerais.....	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPP – Dual-Path Platform

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

LVC – Leishmaniose visceral canina

LV – Leishmaniose visceral

LTH – Leishmaniose tegumentar humana

µL - Microlitros

ng – Nanograma

PCR – Reação em cadeia de polimerase

RFLP - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição

RIFI – Reação de imunofluorescência

SUMÁRIO

1	Introdução	19
1.1	Leishmaniose visceral canina	21
1.2	<i>Babesia</i> spp.	24
1.3	<i>Ehrlichia canis</i>	26
1.4	<i>Anaplasma platys</i>	27
1.5	Ambientes com elevado número de animais	29
1.6	Pulgas	31
1.7	Tripanossomatídeos monoxênicos	32
2	Objetivo	35
2.1	Objetivo geral.....	35
2.2	Objetivos Específicos	35
3	Material e métodos	36
3.1	Estrutura do trabalho.....	36
3.1.1	Estudo 1 - Epidemiologia da leishmaniose visceral canina em ambientes com elevado número de animais no estado de Minas Gerais, Brasil.	36
3.1.2	Estudo 2 - Estudo de coinfeções por hemoparasitos em cães soropositivos para LV oriundos de ambientes com elevado número de animais no estado de minas gerais, Brasil.	36
3.1.3	Estudo 3 - Leishmaniose Visceral Canina em áreas endêmicas e o estudo de <i>Ctenocephalides felis felis</i> no ciclo de <i>Leishmania infantum</i>	36
3.2	Aspectos éticos	36
3.3	Animais do estudo.....	36
3.4	Estudo 1	39
3.4.1	Diagnóstico sorológico	39
3.4.2	Diagnóstico molecular	39
1.1.3	Avaliação Clínica	40
1.1.4	Bioquímicos e hemograma	40
1.1.5	Análises estatísticas	41
3.5	Estudo 2.....	41
3.5.1	Diagnóstico laboratorial	41

3.6	Estudo 3.....	43
3.6.1	Área de coleta.....	43
3.6.2	Identificação das pulgas	44
3.6.3	Extração de DNA de fragmentos de pele	44
3.6.4	Extração de DNA de pulgas.....	44
3.6.5	Meio de cultura – Isolamento de <i>Leishmania infantum</i>	45
3.6.6	Meio de cultura pulgas – Isolamento de tripanossomatídeos	45
3.6.7	Extração de DNA das massas de cultura.....	45
3.6.8	Análises moleculares	46
3.6.8.1	Fragmento de ponta de orelha	46
3.6.8.2	Pulgas.....	47
3.6.8.3	Isolados das peles e das pulgas	47
3.6.8.4	RFLP	47
3.6.8.5	Sequenciamento e análise filogenética	48
4	Resultados	49
4.1	Estudo 1.....	49
4.1.1	Sorologia	49
4.1.2	Biologia molecular – <i>Leishmania</i> spp.....	51
4.1.3	Avaliação clínica	53
4.1.4	Patologia clínica.....	56
4.2	Estudo 2.....	57
4.2.1	Biologia Molecular.....	57
4.3	Estudo 3.....	58
4.3.1	Inspeção clínica	58
4.3.1.1	Itabirito – Sinais clínicos	58
4.3.1.2	Itabirito – Infestação de pulgas	59
4.3.1.3	Sabará – Sinais clínicos.....	59
4.3.1.4	Sabará – Infestação de pulgas	61
4.3.2	Análises moleculares	61

4.3.2.1 PCR-RFLP Peles.....	61
4.3.2.2 PCR Pulgas	63
4.3.2.3 Isolamento – Amostras de pele.....	64
4.3.2.4 Isolamento – Amostras de pulga.....	66
5 Discussão.....	68
5.1 Estudo 1.....	68
5.2 Estudo 2.....	72
5.3 Estudo 3.....	78
6 Conclusões.....	84
Referências.....	86
Apêndice.....	107
Apêndice I – Artigo publicado referente ao estudo 1 deste trabalho.....	107
Anexo.....	115
Anexo I – Parecer do Comitê de Ética de Uso Animal	114

1 Introdução

A leishmaniose visceral (LV), no Brasil, é uma doença zoonótica causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e é transmitida para animais e humanos pela picada da fêmea de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) durante seu repasto sanguíneo. São registrados, em média, por ano, cerca de 3.500 novos casos de LV humana e o coeficiente de incidência é de 2.0 casos/100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Os cães são os principais reservatórios do parasito na área urbana e o controle da doença nestes animais é extremamente relevante para que haja um controle da doença no humano (GAVGANI *et al.*, 2002; QUINNELL; COURTENAY, 2009), principalmente, considerando que os cães estão cada vez mais inseridos na sociedade, fazendo parte das famílias.

É sabido que existem pessoas que se autointitulam protetores de animais e cuidam de um número elevado de cães, recolhem e recebem animais abandonados e errantes. Mas, por não conseguirem novos destinos para esses animais ou por não conseguirem se desapegar dos animais, suas casas se transformam em uma aglomeração canina, proporcionando uma alta densidade de animal por metro quadrado, o que contribui para a disseminação de agentes transmitidos por vetores como *L. infantum*. Muitas vezes são responsáveis que não possuem renda suficiente para manter os animais em boas condições de saúde e higiene, dependendo de doações de produtos de limpeza, de alimentos e de atendimentos veterinários voluntários. Isto se torna um grande problema se considerarmos regiões endêmicas para leishmaniose visceral canina (LVC), pois essas residências podem se tornar focos do parasito tanto para os animais que nelas habitam quanto para os moradores e vizinhança (LIMA *et al.*, 2012; SOCCOL *et al.*, 2017). Em um recente trabalho foi descrito que há alguns tipos diferentes de indivíduos em situações de acumulação, como, cuidador sobrecarregado, salvador em uma missão e explorador de animais (CEDEF, 2021). Contudo, a literatura é escassa em relação à sanidade dos animais neste tipo de ambiente e em relação às leishmanioses, visto que pouco

se conhece sobre sua prevalência nestes locais de aglomeração, a situação clínica destes animais e as espécies de parasitos que circulam neste contexto.

Embora a transmissão natural do agente etiológico da doença, o protozoário da espécie *L. infantum*, ocorra principalmente pela picada de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, outros mecanismos de transmissão provavelmente estejam envolvidos na epidemiologia da leishmaniose visceral canina (LVC). Este fato se justifica devido à alta prevalência de cães infectados em regiões endêmicas, (FRANÇA-SILVA *et al.*, 2005; MALAQUIAS *et al.*, 2007; MICHALSKY *et al.*, 2007; PAZ *et al.*, 2010b; ROMERO; BOELAERT, 2010), mesmo com uma baixa taxa de infecção natural por *L. infantum* no vetor biológico, não excedendo em sua maioria 0,5% (MONTROYA-LERMA *et al.*, 2003). Uma hipótese a ser considerada é a participação de outros vetores na manutenção e transmissão de *L. infantum* para a população canina, explicando a alta prevalência da infecção e a ineficácia das medidas de controle que são direcionadas somente para o combate de *L. longipalpis*.

Resultados obtidos até o momento apontam fortes evidências da importância de *Ctenocephalides felis felis* na epidemiologia da LVC atuando, provavelmente, como vetor mecânico deste protozoário. Em um estudo de campo, os pesquisadores coletaram 5556 amostras sanguíneas de cães de área endêmica das quais 432 (7,8%) apresentaram anticorpos anti – *Leishmania* detectados pelo ELISA e pela RIFI, ambos BioManguinhos. Este resultado permitiu a formação dos grupos dos animais soropositivos e soronegativos necessários para avaliar a associação de infestação com pulga e soropositividade. As pulgas coletadas nestes animais foram identificadas como sendo da espécie *C. felis felis*. A prevalência de infestação por *C.felis felis* no grupo de animais soropositivos foi significativamente superior (36,5%) que a do grupo soronegativo (15,0%) ($p < 0,01$). Além disso, a chance de positividade para *Leishmania* sp foi cerca de 3 vezes mais alta nos cães com infestação por pulga (OR = 3,13; IC95% = 1,94-5,06) (PAZ, *et al.*, 2010a). Coutinho (2007) e Ferreira *et al.* (2009) comprovaram a detecção molecular de *Leishmania* spp. em

espécimes alimentadas em cães com LVC e demonstraram a transmissão mecânica experimental em hamsters pela ingestão de pulgas infectadas por *Leishmania* spp. Além disso, as pulgas apresentam alta taxa de infecção natural por outros tripanossomatídeos como *Leptomonas*, *Herptomonas* e *Crithidia* (LINARDI e GUIMARÃES, 2000).

1.1 Leishmaniose visceral canina

A LV é uma doença de distribuição mundial, sendo encontrada em países da Europa, da Ásia, da África e das Américas, e o Brasil é o país das Américas com o maior número de casos humanos e caninos e aqui são registrados em média 2.500 casos por ano de leishmaniose visceral em humanos e uma taxa de incidência de 1,2 casos para cada 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). É uma doença encontrada nas cinco regiões brasileiras e em expansão em localidades até então isentas.

No Brasil, a LV é causada pelo protozoário da espécie *Leishmania infantum*, parasito intracelular obrigatório de células do sistema mononuclear fagocitário de seus hospedeiros vertebrados, sendo os macrófagos as células mais acometidas. Nestes hospedeiros a forma encontrada do parasito é a amastigota, a qual possui o flagelo interiorizado. Nos flebotomíneos, hospedeiros invertebrados, são encontradas as formas promastigotas e promastigotas metacíclicas (formas infectantes), as quais possuem o flagelo exteriorizado (NICOLLE, 1908; DEANE; DEANE, 1955).

Os flebotomíneos das espécies *Lu. longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* são os principais vetores da *L. infantum* no Brasil, e algumas outras espécies como *Lutzomyia migonei* e *Pintomyia fischeri* são descritas como permissivas para *L. infantum* e como possíveis vetores (GALVIS-OVALLOS *et al.*, 2021; RÉGO *et al.*, 2020; GUIMARÃES *et al.*, 2016) são descritas como permissivas para *L. infantum* e como possíveis vetores (GUIMARÃES *et al.*, 2016). Há outras formas de transmissão descritas como transfusão de sangue, congênitas, venéreas, mas até o momento estes tipos de transmissão não possuem relevância epidemiológica. Além

desses, muito se discute sobre a possibilidade de outros insetos atuarem como vetores da *L. infantum*, como os ectoparasitos que acometem os animais.

Em relação aos vertebrados, muitas são as possibilidades de hospedeiros, o que dependerá do ambiente no qual a doença está inserida. Na área urbana, além do homem, que pode vir à óbito se não tratado, há o cão que apresenta grande importância pelo seu papel como reservatório do parasito. O cão infectado, geralmente, apresenta elevada carga parasitária na pele, o que facilita a infecção do flebotomíneo quando ocorre o repasto sanguíneo (GIUNCHETTI *et al.*, 2008). Sendo assim, é comumente observado que os casos caninos precedem os casos humanos, tornando-os hospedeiros cruciais para a manutenção do ciclo do parasito em área urbana. Outros hospedeiros vertebrados são os animais sinantrópicos e os animais silvestres como gambás, roedores e pequenos mamíferos (FERREIRA *et al.*, 2015).

Para o diagnóstico dos casos caninos é preconizado que sejam realizados dois testes sorológicos. O primeiro é o DPP - Bio-Manguinhos®-Fiocruz/MS, um teste mais sensível e que é utilizado para a triagem dos animais positivos. As amostras positivas são submetidas ao segundo teste, o ELISA - Bio-Manguinhos®-Fiocruz/MS, um teste mais específico e que confirma os animais positivos. São testes que possuem boa confiabilidade por apresentarem bons valores de sensibilidade e especificidade; contudo, na prática, tem-se observado que nem sempre cães positivos nestes testes são realmente positivos para a espécie *L. infantum*. Têm sido encontradas amostras de cães infectados com outras espécies de *Leishmania* apresentando reações cruzadas, como exemplo, animais infectados com *L. amazonensis* (PAZ *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2019). Esta informação é importante dentro da epidemiologia e da clínica da leishmaniose visceral canina, uma vez que animais podem ser submetidos à eutanásia e ao tratamento para a infecção por *L. infantum*, sendo que, na verdade, sua infecção é por outra espécie ou até mesmo por mais de uma espécie.

Dentre essas outras espécies está a *L. amazonensis* que pertence ao subgênero *Leishmania* assim como a espécie *L. infantum*, contudo, pertence ao grupo das

espécies responsáveis por causar leishmaniose tegumentar. É um parasito que gera infecções difíceis de serem tratadas e tem se mostrado bastante resistente aos tratamentos instituídos (CONVIT *et al.*, 1993; SCORZA *et al.*, 2017). *Leishmania amazonensis* tem como principal vetor o flebotomíneo da espécie *Lutzomyia flaviscutellata*, mas outras espécies também já foram descritas como permissivas para a infecção por esta espécie. Além disso, a presença de *L. amazonensis* em regiões nas quais ainda não havia sido descrita tem mostrado sua expansão dentro do país. Os hospedeiros vertebrados mais comuns são humanos que vivem próximos a regiões de mata e mamíferos silvestres. Há um tempo, esta espécie de *Leishmania* era mais encontrada, principalmente, na região Norte do país, mas com sua expansão pelo território brasileiro, outros hospedeiros como o cão doméstico e pequenos roedores vêm sendo descritos em outras regiões do país (DIAS *et al.*, 2011; PAZ, *et al.*, 2018; VALDIVIA *et al.*, 2017).

Uma outra espécie que pertence ao grupo dos parasitos causadores de leishmaniose tegumentar, mas diferente da *L. amazonensis* e que pertence ao subgênero *Viannia* é a *Leishmania guyanensis*. Esta espécie é descrita na região Norte do Brasil, principalmente no interior da floresta amazônica e tem como principal vetor o flebotomíneo da espécie *Nyssomyia umbratilis* (WARD & FRAIHA, 1977). Os principais hospedeiros vertebrados são animais silvestres, incluindo os gambás (*Didelphis* sp.) os quais são importantes reservatórios por viverem em diferentes nichos ecológicos e se adaptarem bem a ambientes urbanos e serem antropofílicos. É uma espécie pouco descrita infectando animais domésticos no Brasil.

Diferentemente da infecção por *L. infantum*, ainda é pouco conhecida a patogenia em cães causada pelas infecções por *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. A evolução da LVC pode levar a uma doença de caráter crônico e, mesmo quando é feito o tratamento de forma adequada, pode levar o animal a óbito. Espera-se que o indivíduo infectado apresente uma resposta imune tendenciosa para a resposta do tipo Th1, na qual haverá ativação de macrófagos, produção de interferon-gama (IFN-

γ), fator de necrose tumoral (TNF-α) e interleucina-12 (IL-12), ou seja, uma resposta com atividade leishmanicida. Porém, alguns animais apresentam uma resposta mais tendenciosa para o tipo Th2, na qual há grande aumento na produção de anticorpos que, geralmente, nesta doença, estão associados às principais alterações observadas, devido a formação intensa de complexos antígeno-anticorpo que vão se acumulando em determinadas regiões do corpo do animal, como, por exemplo, nos glomérulos renais, endotélio vascular, capilares sanguíneos e articulações (BANETH *et al.*, 2008; KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1994).

Em países de clima tropical, como o Brasil, é comum cães serem diagnosticados com mais de um patógeno transmitido por vetores hematófagos, como flebotomíneos, carrapatos e pulgas. Inclusive, esses artrópodes, geralmente, podem ser hospedeiros e podem transmitir mais de um agente patogênico, concomitantemente (YISASCHAR-MEKUZAS *et al.*, 2013). Realizar a detecção de coinfeções nos animais e fazer a identificação correta dos parasitos presentes na infecção é extremamente importante para que sejam instituídos tratamentos e medidas preventivas adequadas. Ademais, coinfeções por *L. infantum* e hemoparasitos como *Babesia* spp., *E. canis* e *A. platys* podem induzir manifestações clínicas mais severas quando comparadas com infecções por um único agente e podem ser um desafio diagnóstico e terapêutico (OTRANTO; DANTAS-TORRES; BREITSCHWERDT, 2009).

1.2 ***Babesia* spp.**

A babesiose é uma doença endêmica no Brasil e as principais espécies descritas parasitando cães são *Babesia canis vogeli* e *Babesia gibsoni*. São protozoários intraeritrocíticos, transmitidos por carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006).

Durante o repasto sanguíneo, os carrapatos infectados inoculam a saliva contendo esporozoítos, que penetram os eritrócitos e se multiplicam por divisão binária transformando-se em merozoítos. Após a lise do eritrócito, os merozoítos parasitam outras hemácias, ocorrendo mais multiplicação e novas células

parasitadas (ADACHI *et al.*, 1993; CHAUVIN *et al.*, 2009). Nos carrapatos pode ocorrer a transmissão transestadial ou horizontal e a transmissão transovariana ou vertical (O'DWYER e MASSARD, 2002; TRAPP *et al.*, 2006), facilitando a transmissão do agente para os hospedeiros vertebrados.

Os cães infectados podem apresentar uma doença aguda, crônica ou subclínica e os sinais clínicos geralmente variam desde uma anemia hemolítica, febre, letargia, anorexia, esplenomegalia, icterícia até uma insuficiência renal, hepatopatia, desconforto respiratório e lesões no sistema nervoso central (LOBETTI *et al.*, 2002). A anemia tende a ser mais observada durante a fase aguda da infecção, sendo do tipo normocítica normocrômica (VASCONCELOS, 2010). Com relação as alterações leucocitárias podem ser observadas leucopenia, leucocitose, neutrofilia, neutropenia, linfocitose e eosinofilia (ZYGNER *et al.*, 2007).

Em relação às alterações bioquímicas, pode ser encontrado o aumento da aspartato amino-transferase (AST), da alanina aminotransferase (ALT) e da fosfatase alcalina (FA), hiperbilirrubinemia, hipoalbuminemia, aumento dos níveis séricos de creatinina, ureia e hipergamaglobulinemia (DE SCALLY *et al.*, 2006; LOBETTI *et al.*, 2000). Contudo, nem sempre essas alterações são observadas, podendo ser bem sutis em uma doença mais branda.

Para o diagnóstico da infecção podem ser usados em associação os achados clínicos, exames parasitológicos, testes sorológicos e testes moleculares (O'DWYER e MASSARD, 2002). Geralmente, na fase aguda da infecção é mais fácil observar os merozoítos em lâminas de esfregaço sanguíneo, entretanto, se a parasitemia está baixa ou a infecção está em uma fase mais crônica, pode ser difícil observá-los. Os testes sorológicos são os mais utilizados na rotina clínica e eles podem mostrar que o indivíduo teve o contato com o parasito, mas não necessariamente que está infectado. Isto ocorre porque eles detectam anticorpos que podem ser de memória, sendo assim, nem sempre o teste sorológico é a melhor opção para definir uma infecção de *Babesia* spp.. Os testes moleculares, quando positivos, dão a certeza da infecção, mostrando que ela está ativa. Possuem boa sensibilidade e especificidade

e, além disso, podem diferenciar as espécies envolvidas (CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2003).

1.3 *Ehrlichia canis*

A ehrlichiose monocítica canina (EMC) é uma doença de grande importância que acomete os cães. É causada por bactérias intracelulares obrigatórias, pertencentes à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, gênero *Ehrlichia* e espécie *Ehrlichia canis* (DUMLER *et al.*, 2001).

A transmissão para os cães ocorre através do repasto sanguíneo de carrapatos da espécie *R. sanguineus*, e as bactérias são mantidas nos vetores através da transmissão transtádial (LABRUNA, PEREIRA, 2001). No hospedeiro vertebrado, a multiplicação de *E. canis* ocorre nas células mononucleares fagocíticas do hospedeiro. No interior dessas células são formados os vacúolos onde estão inseridas as mórulas (COHN, 2003).

O cão infectado pode apresentar as fases subclínica, aguda ou crônica, e pode também ter ausência de sinais clínicos. Os sinais clínicos mais observados podem ser perda de peso, letargia, febre, esplenomegalia, linfadenomegalia e petéquias. Também podem ser observados conjuntivite, uveíte, retinopatias e tendências a hemorragias (DE CASTRO *et al.*, 2004; NEER, 2006; MIRÓ *et al.*, 2013).

Em relação às alterações hematológicas, as principais encontradas são anemia, trombocitopenia e leucopenia, por neutropenia e linfopenia, que podem ter suas intensidades de acordo com a fase da doença em que o animal se encontra (HARRUS; WANER, 2011). Contudo, a alteração mais observada em infecções por *E. canis* em todas as suas fases é a trombocitopenia, que pode estar presente devido ao aumento de consumo das plaquetas, pela vasculite, pela supressão da medula e pela presença de processos imunomediados (SHROPSHIRE *et al.*, 2018).

As alterações bioquímicas não são patognomônicas, mas as variações observadas podem estar presentes nas três fases da infecção. Podem ocorrer danos

hepáticos levando ao aumento da atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT), da fosfatase alcalina (FA) e aumento de bilirrubina total. Também pode ser encontrada azotemia, pela diminuição da perfusão renal e devido a lesão renal (COHN, 2003; COSTA et al., 2015). Como são alterações que podem ser detectadas em outras doenças, testes de diagnósticos são importantes para a confirmação da infecção.

Para o diagnóstico direto da infecção, pode ser observada a presença do agente, em forma de mórulas, em esfregaços sanguíneos de sangue periférico. Mas a ausência de observação não exclui o diagnóstico, principalmente na fase crônica da infecção, na qual a observação do agente é mais difícil (HARRUS et al., 1998). Também são muito utilizados os testes sorológicos para o diagnóstico, como o ELISA e a RIFI. A partir de sete dias de infecção é possível observar a produção de IgM, já com 15 dias é possível detectar IgG (MYLONAKIS et al., 2019). Um teste ainda mais sensível é a PCR, por conseguir amplificar quantidades mínimas de DNA, por determinar a espécie de *Ehrlichia* envolvida na infecção e por ser um diagnóstico rápido e preciso (ROMERO et al., 2011). Porém, é também um teste que, quando o resultado é negativo, não se pode excluir a infecção, uma vez que os órgãos do sistema monocítico fagocitário podem sequestrar o agente, interferindo na capacidade do teste de amplificar o DNA (HARRUS; WANER, 2011).

1.4 *Anaplasma platys*

O agente etiológico *Anaplasma platys* é o causador da doença conhecida como trombocitopenia cíclica infecciosa canina (TCC). Diversos mamíferos já foram descritos infectados com este agente, contudo, os cães são os hospedeiros mais comuns (HEGARTY et al., 2015; PEREIRA et al., 2016; QUROLLO et al., 2014; SANTARÉM et al., 2005). No hospedeiro vertebrado, infectam plaquetas e, dentro dos vacúolos, por repetidas fissões binárias, formam as mórulas (HARVEY, et al., 1978).

Com relação ao hospedeiro invertebrado, acredita-se que o carrapato da espécie *R. sanguineus* seja o vetor, assim como ocorre com outros hemoparasitos,

embora ainda não seja bem descrita esta participação. Suspeita-se desta participação uma vez que já foi encontrado DNA de *A. platys* em carrapatos, inclusive em adultos e ninfas de *R. sanguineus* coletados de cães negativos, o que sugere uma transmissão transtadiária entre esses ectoparasitos (DAHMANI *et al.*, 2015; RAMOS *et al.*, 2014). Também foi descrita a possibilidade da transmissão vertical entre uma cadela gestante e seus filhotes (LATROFA *et al.*, 2016).

Muitos cães infectados, frequentemente, são descritos com ausência de sinais clínicos, mas quando estes sinais estão presentes, são citados como os mais comuns, febre, letargia, palidez de mucosa, petéquias, epistaxe e linfadenomegalia (BREITSCHWERDT, 2000). Não tão comuns, mas também podem ser observados dificuldade respiratória, secreção ocular, esplenomegalia e hiperqueratose no focinho (SAINZ *et al.*, 1999).

A alteração hematológica mais observada é a trombocitopenia, mas também podem ser observadas anemia, macroplaquetas e monocitose (ANTOIGNONI *et al.*, 2014; DAGNONE *et al.*, 2003). Durante a fase aguda da doença, há uma elevada quantidade de plaquetas circulantes parasitadas e, em alguns dias após a fase aguda, há uma redução nas plaquetas infectadas circulantes, devido ao fenômeno de agregação plaquetária. Após a redução dos parasitos na circulação, o número de plaquetas circulantes retorna ao esperado. Sete a quatorze dias após o episódio ocorre uma nova parasitemia, e haverá nova redução de plaquetas circulantes. Com a cronificação da doença, o processo cíclico tende a reduzir, levando a esporádicas observações do parasito e trombocitopenias moderadas (BAKER *et al.*, 1987; SILVA, 2010; WOODY; HOSKINS, 1991).

Alterações bioquímicas são observadas em alguns casos e podem ser encontradas redução na contagem total de leucócitos e discreta hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. Coinfecções com outros patógenos transmitidos por vetores podem acarretar em um maior número de alterações as quais podem ser mais graves (EIRAS *et al.*, 2013; WOODY; HOSKINS, 1991).

Para o diagnóstico da trombocitopenia cíclica canina pode ser feito o exame parasitológico direto através do esfregaço sanguíneo, no qual pode ser observada a presença de mórulas no interior das plaquetas (DUMLER *et al.*, 2001; FERREIRA, *et al.*, 2008; MIRANDA, 2010). Para uma maior chance de diagnóstico utilizando esta técnica, o animal deve estar na fase cíclica de parasitemia, aumentando as chances de visualização do parasito. Os testes moleculares são sensíveis e específicos, sendo indicados também para o diagnóstico da infecção, no entanto, quando a parasitemia está baixa há a chance de obtenção de resultados falso-negativos. Além disso, os testes moleculares vêm contribuindo para estudos epidemiológicos desses patógenos (BREITSCHWERDT *et al.*, 2014). Não são comuns testes sorológicos para o diagnóstico de *A. platys*, uma vez que reações cruzadas com *Anaplasma phagocytophilum* e *E. canis* já foram descritas (FERREIRA, R F *et al.*, 2008).

1.5 Ambientes com elevado número de animais

Conhecer e entender sobre os aspectos associados a doença e a seus fatores determinantes é fundamental para auxiliar no direcionamento e na elegibilidade de estratégias de controle que realmente funcionem. Em relação à LV e a sua tríade ecológica, os fatores de risco estão associados ao vetor, aos hospedeiros potenciais e ao meio ambiente (BORGES *et al.*, 2009; RÊGO, 2001) e sabe-se que quanto maior o número de integrantes dentro de um ciclo de uma doença, mais complexo se torna o seu controle. Sendo assim, os abrigos de animais são locais de importância para o entendimento de doenças infecciosas circulantes nesses ambientes com elevado número de animais.

Estudos realizados para demonstrar fatores de risco para a infecção humana por *L. infantum* associados à presença de cão demonstraram que quanto maior o número de cães em um domicílio, maiores são as chances do humano se infectar (BORGES *et al.*, 2009). Sendo assim, abrigos de animais devem ser investigados quanto a presença de agentes infecciosos, principalmente, quando se trata de agentes zoonóticos.

Pelo fato de muitas vezes esse tipo de abrigo ser gerido por pessoas que apresentam dificuldade em abrir mão dos animais que são recebidos, criando-se um apego emocional muito grande, tornam-se locais nos quais os responsáveis são incapazes de perceber os efeitos negativos com relação ao bem-estar dos animais que lá habitam (PATRONEK; LOAR; NATHANSON, 2006). Em muitos casos, os responsáveis pelos abrigos não possuem condições econômicas para custear todos os gastos de alimentação, medicamentos básicos, como vermífugos e atendimentos médico veterinário, ficando na dependência de apoios externos. O que tem sido observado é que, geralmente, animais que são mantidos em ambientes com um grande número de indivíduos acabam apresentando má nutrição e alterações clínicas, como parasitismo, alterações gastrintestinais e doenças respiratórias (POLAK *et al.*, 2014). Desta forma, acabam também sendo animais mais susceptíveis a doenças infecciosas, dentre elas, as doenças transmitidas por vetores.

Os vetores não são raros em ambientes com grande número de animais, uma vez que há uma enorme fonte de alimentação para eles. Além disso, os abrigos de animais costumam estar localizados em regiões mais periféricas das cidades, sendo assim, são locais mais próximos a regiões de matas e, conseqüentemente, com maior quantidade de matéria orgânica (SILVA *et al.*, 2008). Essas características são ainda mais importantes quando se fala das leishmanioses e de seus vetores.

Na literatura, são poucos os trabalhos que falam sobre esses abrigos, principalmente, com o tema voltado para os animais e para as doenças infecciosas que os envolvem. É de extrema importância saber quais são os agentes que estão circulando nesses ambientes e, inclusive, saber se são agentes zoonóticos. Além disso, os abrigos podem ser locais de disseminação de agentes infecciosos para os habitantes próximos, tanto humanos quanto animais. Então, para que medidas de controle e prevenção sejam feitas de forma eficaz, mais conhecimentos acerca desses ambientes são necessários.

1.6 Pulgas

Pulgas são insetos pertencentes à ordem Siphonaptera, são ápteros, de coloração castanha, achatados lateralmente, possuem o corpo revestido de cerdas, pequenos (2.0-3.0mm) e são bem adaptados ao salto (LINARDI, 2011), característica que faz com que consigam dar vários saltos por minuto e alcancem grandes distâncias quando comparadas ao seu tamanho (ROTHSCHILD et al., 1973). As pulgas apresentam dimorfismo sexual bem definido e as fêmeas são maiores que os machos. As fêmeas possuem a parte posterior do corpo mais arredondada e os machos possuem a extremidade posterior voltada para cima, onde armazenam o aparelho copulador nos últimos segmentos (LINARDI, NAGEM, 1972).

Ambos os sexos são hematófagos, contudo, para as fêmeas a hematofagia é ainda mais importante pelo fato de ser necessária para a maturação dos ovos e, conseqüente, oviposição. Após a postura dos ovos, e com condições ambientais de temperatura, umidade e presença de alimento, o ciclo da pulga dura em média de 25 a 30 dias, passando por três fases larvais, pupa e adulta. É um ciclo de metamorfose completa, ou seja, são holometábolos (LINARDI, GUIMARÃES, 2000).

Para que o ciclo se complete, a alimentação das fases larvais é crucial para que ocorra o desenvolvimento adequado. As larvas se alimentam, principalmente, de sangue digerido eliminado nas fezes das pulgas adultas. As pulgas possuem alimentação do tipo solenófaga, ou seja, se alimentam diretamente sobre os capilares sanguíneos (LINARDI, GUIMARÃES, 2000).

Através do repasto sanguíneo alguns patógenos são transmitidos das pulgas para seus hospedeiros vertebrados, os quais são mamíferos em sua maioria (LINARDI, 2011). As pulgas são consideradas transmissoras de viroses, rickettsioses, doenças bacterianas, protozooses (tripanossomíases), as quais são transmitidas durante o repasto sanguíneo. Atuam também como hospedeiros invertebrados de helmintos, como, por exemplo, *Dipylidium caninum*, transmitido quando a pulga infectada é ingerida pelo cão, o hospedeiro vertebrado (LINARDI,

GUIMARÃES, 2000). Vários gêneros e espécies de tripanossomatídeos monoxênicos também são descritos parasitando pulgas (VOTÝPKA *et al.*, 2013).

Além dessas atuações como vetores e hospedeiros de patógenos, as pulgas são ectoparasitos que infestam seus hospedeiros e, ao realizarem o repasto sanguíneo, causam uma ação espoliativa, irritativa e inflamatória (LINARDI, GUIMARÃES, 2000), o que pode gerar uma queda de imunidade no indivíduo ectoparasitado, facilitando a presença de agentes oportunistas, como bactérias em lesões de pele causadas por arranhões devido a coceira.

Outro aspecto que vem sendo observado é a relação entre cães infestados por pulgas e a positividade para leishmaniose visceral. Na literatura já foi observada uma associação estatística entre infestação por pulga e o risco do cão de estar infectado com *L. infantum* (PAZ *et al.*, 2010b). E, geralmente, animais infestados por ectoparasitos são animais em que os responsáveis não utilizam medidas preventivas de controle de ectoparasitos e endoparasitos, facilitando a presença de infecções.

Além disso, há trabalhos na literatura que detectaram a presença de *Leishmania* sp. em espécimes de pulgas retiradas de cães reagentes para LV e demonstraram a infecção de hamsters por *Leishmania* sp. através de infecção oral com pulgas maceradas, retiradas de cães soro reagentes para LV (Coutinho *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2009).

1.7 Tripanossomatídeos monoxênicos

Os tripanossomatídeos monoxênicos fazem parte da família Trypanosomatidae, todavia, são menos estudados quando comparados com os tripanossomatídeos heteroxênicos por não possuírem importância médica e econômica. Até o momento são pouco conhecidos e, embora possam parecer inofensivos pelo histórico habitual de serem restritos aos insetos, os seres vivos estão em constante evolução e desenvolvendo habilidades de sobrevivência, por exemplo, se adaptando a novos hospedeiros.

Sabendo que muitos insetos servem de hospedeiros para os tripanossomatídeos monoxênicos e que tanto os animais quanto os seres humanos muitas vezes são fontes de alimento para esses insetos, tornam-se necessárias mais investigações sobre a presença desses tripanossomatídeos em vertebrados. A vigilância sobre esses agentes é fundamental, uma vez que doenças emergentes podem vir à tona. Um exemplo é o gênero *Crithidia* que está presente em insetos como mosquitos (*Culex*), abelhas, besouros, entre outros, que podem ser encontrados tanto em áreas rurais quanto em áreas urbanas (ISHEMGULOVA *et al.*, 2017; LIPA, TRIGGIANI, 1988; YURCHENKO *et al.*, 2009).

Outro exemplo são os tripanossomatídeos monoxênicos presentes em pulgas, principalmente aos pertencentes à espécie *Ctenocephalides felis felis*. Este ectoparasito possui uma relação parasito-hospedeiro muito estreita com os cães no Brasil e, conseqüentemente, possuem uma proximidade com humanos (VOTÝPKA *et al.*, 2013).

Além disso, vertebrados vêm sendo descritos parasitados com tripanossomatídeos monoxênicos. Morcegos, quatis, jaguatiricas, que fazem parte de diferentes biomas brasileiros, já foram encontrados sendo parasitados por *Crithidia mellificae* (RANGEL *et al.*, 2019; DARIO *et al.*, 2021).

Atentando-se para o fato de que em áreas urbanas o cão é o principal reservatório de *Leishmania infantum* e que este parasito pode debilitar o animal tornando-o muito doente e que, geralmente, estes animais são ectoparasitados por pulgas, torna-se importante investigar possíveis infecções por tripanosomatídeos monoxênicos em cães com leishmaniose visceral. Alguns pontos importantes relacionados a esta questão são a possibilidade de haver infecções oportunistas por esses tripanosomatídeos monoxênicos nestes animais; piora no quadro da doença; dificuldade dos cães em responder aos tratamentos e reações cruzadas nos testes sorológicos utilizados para a detecção da infecção por *L. infantum*, uma vez que já foi descrito que primatas não-humanos infectados com *C. mellificae* produziram uma resposta imune-humoral (DARIO *et al.*, 2021).

Mais estudos epidemiológicos sobre o cenário atual da LV são necessários, tendo em vista o processo contínuo de urbanização da doença, a inserção cada vez mais relevante do cão na sociedade e alta prevalência da doença demonstrando a falta de medidas eficazes para o seu controle, principalmente na população canina. Além disso, devemos considerar não somente a detecção de *L. infantum* em determinada área, mas também a forma de como os cães interagem na presença de outras espécies de *Leishmania* e de outros hemoparasitos, além da possibilidade da participação de outros vetores inseridos no ciclo desta doença. Embora a LV seja uma doença grave em cães e humanos e esteja presente no Brasil desde a década de cinquenta, ainda permanece negligenciada e desafiadora para os pesquisadores e gestores responsáveis pelas medidas de controle.

2 Objetivo

2.1 Objetivo geral

Estudar os aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina em ambientes com elevado número de animais, suas coinfeções com outros hemoparasitos e investigar sobre *Ctenocephalides felis felis* no ciclo de *Leishmania infantum*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a soroprevalência de cães infectados por *Leishmania* spp. em ambientes com elevado número de animais.
2. Confirmar a infecção dos cães soro positivos com sinais clínicos brandos e sua etiologia;
3. Determinar o escore clínico dos cães soro reagentes com sinais clínicos brandos da doença;
4. Avaliar a patologia clínica dos cães com diagnóstico etiológico confirmado;
5. Avaliar a ocorrência dos hemoparasitos *Babesia* spp., *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães com leishmaniose visceral oriundos de ambientes com elevado número de animais.
6. Confirmar a infecção de cães soro reagentes para *Leishmania infantum* utilizando métodos de biologia molecular.
7. Determinar a ocorrência de *Leishmania infantum* em estágios adultos de *Ctenocephalides felis felis* alimentados em cães naturalmente infectados.
8. Isolar as espécies de *Leishmania* circulantes nas pulgas e nos respectivos cães em meio de cultura.
9. Caracterizar os isolados obtidos de pulgas e de amostras dos cães.

3 Material e métodos

3.1 Estrutura do trabalho

O trabalho foi dividido em três estudos distintos, assim, cada um possui seus próprios material e métodos, resultados e discussões.

- 3.1.1 Estudo 1 - Epidemiologia da leishmaniose visceral canina em ambientes com elevado número de animais no estado de Minas Gerais, Brasil.
- 3.1.2 Estudo 2 - Estudo de coinfeções por hemoparasitos em cães soropositivos para LV oriundos de ambientes com elevado número de animais no estado de minas gerais, Brasil.
- 3.1.3 Estudo 3 - Leishmaniose Visceral Canina em áreas endêmicas e o estudo de *Ctenocephalides felis felis* no ciclo de *Leishmania infantum*.

3.2 Aspectos éticos

O estudo 1 e o estudo 2 foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) nº 224/2018-1.2 da Nanocore Biotecnologia S.A e encontra-se de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e pela Lei Federal nº 11.794 de 2008.

O estudo 3 foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) nº LW-14/17 da FIOCRUZ e atende ao disposto na Lei Federal nº 11.794 de 2008 e aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

3.3 Animais do estudo

Estudo 1 - Amostras de soro foram coletadas de todos os cães que pertenciam aos proprietários participantes do estudo, totalizando 627 animais (Tabela 1), de diferentes raças, idades e condições clínicas, vivendo em

aglomerações, em residências oriundas de nove cidades endêmicas para as leishmanioses do estado de MG: Belo Horizonte, Contagem, Ribeirão das Neves, Ibirité, Igarapé, Esmeraldas, Santa Luzia, Divinópolis e Ipatinga. As residências de cada município foram nomeadas com letras e números para identificá-las, R1 (Belo Horizonte), R2, R3 e R4 (Contagem), R5 e R6 (Divinópolis), R7, R8 e R9 (Esmeraldas), R10, R11 e R12 (Ibirité), R13 (Igarapé), R14 e R15 (Ipatinga), R16 (Ribeirão das Neves) e R17 (Santa Luzia). A escolha das cidades foi o fato de serem cidades endêmicas para LVC e terem casos autóctones humanos descritos. Para a escolha das residências foram selecionadas aquelas que possuíam pelo menos 10 cães, além da concordância do proprietário em participar do projeto de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado por eles.

Estudo 2 - Os animais participantes deste estudo fazem parte dos abrigos citados no estudo 1. Foram investigados 159 cães soropositivos nos testes DPP (Bio-Manguinhos®-Fiocruz/MS, Brasil) e ELISA (IDEXX® Laboratories Inc. Westbrook, Maine, USA) para leishmaniose visceral. São cães que vivem em abrigos com elevado número de animais localizados em regiões endêmicas para leishmaniose visceral canina. A intenção seria utilizar todos os 211 cães que foram soropositivos no capítulo anterior, contudo, os responsáveis pelos animais autorizaram a investigação de hemoparasitos em 159 animais. Foram coletadas amostras de sangue total destes animais para a detecção dos hemoparasitos.

Estudo 3 - Os cães participantes do estudo eram sabidamente soro reagentes no DPP (Bio-Manguinhos® - FIOCRUZ/MS, Brasil) e no ELISA (Bio-Manguinhos® - FIOCRUZ/MS) para *L. infantum*. As sorologias destes animais foram realizadas a partir de demanda espontânea, ou seja, os responsáveis dos animais solicitavam a presença dos agentes em suas residências para a realização dos exames. Geralmente, estes pedidos são feitos pelos responsáveis quando o animal já apresenta sinais clínicos bem intensos e, muitas vezes, são manifestações compatíveis com as observadas para a LV.

Ao serem positivos em ambos os testes (DPP e ELISA) e com autorização dos responsáveis, os cães eram recolhidos em suas casas e levados para o CCZ para que fosse realizada a eutanásia. Posteriormente, eram feitas as coletas de materiais para este trabalho.

Tabela 1 – Número de cães presente em cada residência estudada.

CIDADE	RESIDÊNCIA	Nº DE CÃES
Belo Horizonte	R1	37
	R2	10
Contagem	R3	14
	R4	51
Divinópolis	R5	24
	R6	20
Esmeraldas	R7	21
	R8	19
	R9	32
Ibirité	R10	28
	R11	17
	R12	30
Igarapé	R13	54
Ipatinga	R14	45
	R15	23
Ribeirão das Neves	R16	95
Santa Luzia	R17	107
Total		627

3.4 Estudo 1

3.4.1 Diagnóstico sorológico

Foram realizados os testes sorológicos nos 627 cães do estudo, sendo o Dual-Path Platform (DPP Bio-Manguinhos®-Fiocruz/MS, Brasil) para triagem e o ELISA (IDEXX® Laboratories Inc. Westbrook, Maine, USA) como confirmatório. O teste da IDEXX possui boa especificidade (RIBEIRO et al., 2019), por isso foi escolhido como o teste para confirmar os casos positivos. Os animais considerados positivos foram aqueles que apresentaram resultados positivos em ambos os testes.

3.4.2 Diagnóstico molecular

Dos 627 cães, 211 foram soropositivos em ambos os testes sorológicos. Do total de 211 cães, 93 apresentavam sinais clínicos intensos e foram confirmados como positivos para *L. infantum*. Para os 118 animais restantes, que apresentavam sinais clínicos leves ou ausência de alterações clínicas aparentes, foi realizada a técnica de biologia molecular PCR-RFLP para a confirmação da infecção por *L. infantum*.

Inicialmente foram coletadas amostras de medula e pele, contudo, devido à baixa positividade destas amostras, também foram utilizadas amostras de linfonodo poplíteo na tentativa de aumentar a sensibilidade do exame, embora, nem sempre este órgão seja palpável, dificultando a coleta em alguns animais. Assim, foram coletadas 118 amostras de pele, 116 de medula e 65 de linfonodo. O DNA de pele foi extraído utilizando o Puregene® Cell and Tissue kit e para as amostras de medula e linfonodo foi utilizado o PureLink® Genomic DNA Mini Kit. Todas as extrações foram realizadas seguindo as recomendações dos fabricantes.

Para o diagnóstico molecular de *Leishmania* sp. foi realizada a PCR-RFLP utilizando o alvo ITS1 (LITSR – 5' CTG GAT CAT TTTCCG ATG 3' / L5.8S – 5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3') (EL TAIL et al., 2000). O volume final para a PCR foi de 25µL (5µL de DNA, 2.5µL de tampão, 0,5µL de dNTPs, 1.25µL de DMSO, 1.25µL

de *primer forward*, 1.25µL de *primer reverse*, 0.75µL de MgCl₂, 0.25µL de Taq polimerasee 12.25µL de água). O protocolo usado no termociclador para a amplificação do DNA molde foi desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; a extensão final foi a 72°C por 10 minutos. Para a RFLP, 10µL dos produtos da PCR juntamente com 1µL da enzima HaeIII, 0.15 µL de BSA, 1.5µL de tampão e 2.35µL água, foram mantidos a temperatura de 37°C durante 2 horas. Após este período de incubação os resultados foram observados em gel de agarose a 2%. Como controles positivos utilizaram-se cepas referências para *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

1.1.3 Avaliação Clínica

Os 118 cães que que entraram para as análises moleculares, foram submetidos a uma inspeção clínica detalhada para a observação de sinais clínicos que, geralmente, são observados em infecções por *L. infantum*, como perda de peso, dermatopatias, secreções oculares, onicogribose, feridas, linfadenomegalia, atrofia muscular, dentre outros.

Foi realizada uma classificação do escore clínico para avaliar se haveria diferença significativa entre os sinais clínicos dos animais positivos e dos negativos na PCR. Para a definição do escore clínico foi realizada uma inspeção mais rigorosa na qual a intensidade das manifestações clínicas variava de 0 a 3 sendo: 0 – Ausente, 1 – Presente/Moderado, 2 – Intenso e 3 – Severo (NOGUEIRA *et al.*, 2019), os valores foram somados dando um escore final para cada animal.

1.1.4 Bioquímicos e hemograma

Dos 118 cães submetidos às análises moleculares, foram coletadas amostras de sangue em tubo contendo EDTA de 69 cães para a execução dos hemogramas e em tubos sem anticoagulante para a realização dos exames bioquímicos. Houve

variação no número de animais avaliados pois ao retornarmos aos abrigos para as coletas, estes foram os animais permitidos pelos tutores de serem submetidos a novas coletas de amostras. As análises hematológicas foram realizadas no Hospital Veterinário Santo Agostinho, situado na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Para a realização dos hemogramas foi utilizado o Analisador de hematologia IDEXX® ProCyte Dx e para os exames bioquímicos, o Analisador de bioquímica IDEXX® Catalyst One e os intervalos de referência foram de acordo com a fabricante dos aparelhos e reagentes, IDEXX®.

1.1.5 Análises estatísticas

Estatísticas descritivas foram usadas para resumir o conjunto de dados por meio de construção de tabelas de frequência para variáveis categóricas e a avaliação de medidas de tendência central (média e mediana) e variabilidade (desvio padrão e distância interquartil) para variáveis. Para facilitar a comparação das taxas de soropositividade entre as cidades, os dados de todos os abrigos em um único local foram combinados e submetido ao teste do χ^2 . Resultados das análises de PCR-RFLP de tecidos de pele, de medula e linfonodos foram considerados em pares e um animal foi considerado PCR+ quando o DNA de *Leishmania* foi detectado em pelo menos um tecido. A complementaridade do par foi definida como a porcentagem de PCR+ em relação ao número total de amostras daquele par em particular (PAZ *et al.*, 2018). O teste χ^2 de Pearson foi usado para determinar a associação entre variáveis categóricas. Em todos os testes, o nível de significância estatística foi estabelecido com 5% de probabilidade.

3.5 Estudo 2

3.5.1 Diagnóstico laboratorial

Para o diagnóstico molecular de *Leishmania* sp. foi realizada a PCR-RFLP utilizando o alvo ITS1 (LITSR – 5' CTG GAT CAT TTCCG ATG 3' / L5.8S – 5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3') (EL TAIL *et al.*, 2000). O volume final para a PCR foi de 25 μ L (5 μ L de DNA molde, 2,5 μ L de tampão, 0,5 μ L de dNTPs, 1,25 μ L de DMSO, 1,25 μ L de *primer forward*, 1,25 μ L de *primer reverse*, 0,75 μ L de MgCl₂, 0,25 μ L de

Taq polimerasee 12.25µL de água). O protocolo usado no termociclador para a amplificação do DNA molde foi desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; a extensão final foi a 72°C por 10 minutos.

Para o diagnóstico de *Babesia* spp. e *Ehrlichia canis* foi utilizada a técnica de PCR Multiplex (PALAVESAM *et al.*, 2018) com os *primers* não específicos Partial 18S rRNA Gene (619pb) (Ba103F – 5' CCA ATC CTG ACA CAG GGA GGT AGT GAC A 3' / Ba721R – 5' CCC CAG AAC CCA AAG ACT TTG ATT TCT CTC AAG 3'); para *Babesia* spp. Partial 18S rRNA Gene (457pb) (FP18SBa – 5' AGG GAG CCT GAG AGA CGGCTA CC 3' / RP18SBa – 5' TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC 3'); para *Ehrlichia canis* Partial VirB9 Gene (377pb) (Ehr1401F – 5' CCA TAA GCA TAG CTG ATA ACC CTG TTA CAA 3' / Ehr1780R – 5' TGG ATA ATA AAA CCG TAC TAT GTA TGC TAG 3'). As reações eram feitas com 1.5µL de DNA molde, 5µL de Green Taq, 2.5µL de água, 0.5 µL do *primer forward* e 0.5 µL do *primer reverse*. Para a amplificação dos DNAs moldes o protocolo usado foi desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, a extensão final foi a 72°C por 10 minutos. Os *amplicons* foram revelados em gel de agarose a 1.5%.

O diagnóstico de *Anaplasma platys* foi realizado através da técnica de Nested-PCR utilizando o gene 16S rRNA de acordo com RAMOS *et al.* (2009), para a 1ª reação os *primers* foram: 8-F 5' AGT TTG ATC ATG GCT CAG 3' / 1448-R 5' CCA TGG CGT GAC GGG CAG TGT 3', para a 2ª reação (678Ppb) foram os *primers*: PLATYS-F 5' GAT TTT TGT CGT AGC TTG CTA TG 3' / EHR16S-R 5' TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC 3'). As reações eram feitas com 1µL de DNA molde, 5µL de Green Taq, 3.6µL de água e 0.4 mix de *primers*. A amplificação do DNA molde seguiu este protocolo: 1ª reação – desnaturação a 94° por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 1 minuto e extensão a 72° por 40 segundos, com a extensão final a 72°C por 4 minutos; 2ª

reação - desnaturação a 94° por 1 minuto, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 53°C por 30 segundos e extensão a 72° por 30 segundos, com a extensão final a 72°C por 4 minutos. Os *amplicons* foram revelados em gel de agarose a 1%.

Os controles positivos eram de amostras de cães sabidamente positivas para cada hemoparasito.

3.6 Estudo 3

3.6.1 Área de coleta

As áreas de estudo foram a cidade de Sabará - região metropolitana de Belo Horizonte - e Itabirito, que se situa a 58 quilômetros de Belo Horizonte, ambas em Minas Gerais. As coletas foram realizadas mais especificamente nos Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) das Prefeituras das respectivas cidades. As localidades foram escolhidas por situarem-se em áreas endêmicas para leishmaniose visceral.

No primeiro momento das coletas, era feita uma inspeção clínica dos animais, os dados eram preenchidos em uma ficha de identificação de cada cão e os sinais clínicos encontrados eram marcados nas fichas. A veia cava era puncionada para a coleta de sangue total que era armazenado em tubo contendo EDTA e soro em tubo sem anticoagulante. O sangue total foi coletado para extração de DNA e os soros estão armazenados, em freezer -70°C, caso sejam realizados mais estudos.

Posteriormente, o cão era sedado com 0.1mL/Kg de Acepran 0.2% (Acepromazina), aprofundado na sedação com 0.8mL/Kg de Tiopental de Sódio e, então, realizada a eutanásia com 10mL/animal de Cloreto de Potássio (KCl), sem dor ou sofrimento do animal. Esse procedimento está de acordo com o preconizado pelo Ministério da Saúde para casos caninos de LV em que não será feito o tratamento pelo responsável.

Logo após a eutanásia, eram coletados os espécimes de pulgas. Em cada cão demorava-se cinco minutos coletando as pulgas que eram observadas. Posteriormente, eram coletados fragmentos de pele de ponta de orelha utilizando

punchs de 5mm e amostras de pulgas. As amostras eram distribuídas em quatro tubos da seguinte forma: tubo 1 – vazio, para o fragmento de pele ser inserido em meio de cultura; tubo 2 – com solução de RNase para conservar o segundo fragmento de pele para extração de DNA; tubo 3 – com solução salina, antibiótico e antifúngico para as pulgas serem inseridas em meio de cultura; tubo 4 – com RNase para conservação e posterior extração de DNA das pulgas.

A classificação das taxas de infestação dos cães por pulgas foi feita de acordo com a quantidade de pulgas coletadas em cada animal. Desta forma, 1 a 3 pulgas, infestação leve; 4 a 10 pulgas, infestação moderada e acima de 10 pulgas, infestação intensa.

3.6.2 Identificação das pulgas

As pulgas foram analisadas em lupas e identificadas de acordo com a chave de identificação proposta por Linardi e Guimarães (2000).

3.6.3 Extração de DNA de fragmentos de pele

As amostras de pele foram picotadas com lâmina de bisturi em pequenos fragmentos para que as soluções pudessem agir de forma completa sobre toda a amostra. O kit utilizado foi *Gentra Puregene Tissue* (Qiagen®) e o protocolo seguido foi de acordo com as instruções do fabricante.

3.6.4 Extração de DNA de pulgas

As pulgas de cada animal são analisadas separadamente, sendo assim, cada pulga é colocada em um tubo específico com a identificação do animal. O kit utilizado é o *PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen®), mas o protocolo indicado pelo fabricante foi alterado para ser possível obter uma maior concentração de DNA das pulgas.

3.6.5 Meio de cultura – Isolamento de *Leishmania infantum*

As peles eram retiradas do tubo seco que veio do campo e picotadas em pequenos fragmentos com lâmina de bisturi. Os fragmentos obtidos eram colocados em meio de cultura NNN/LIT com penicilina e estreptomicina e mantidos em estufa B.O.D. a 25°C ±1°C. As culturas eram examinadas e repicadas a cada sete dias de cultivo, totalizando 35 dias. As amostras positivas na cultura eram expandidas para a criopreservação e para posterior caracterização molecular.

3.6.6 Meio de cultura pulgas – Isolamento de tripanossomatídeos

As pulgas eram mantidas em *pools* dentro de tubos específicos de cada cão. No laboratório, os *pools* de pulgas eram retirados da solução salina com penicilina, estreptomicina e fluocitosina e colocados em um novo tubo contendo LIT, também complementado com os antibióticos e antifúngico. Estes tubos eram mantidos em temperatura entre 4° e 8°C durante 24 horas e, após este período, as amostras eram maceradas e inseridas em meio de cultura NNN e acrescentava-se mais 500µL de LIT. Os meios de cultura eram mantidos em estufa B.O.D. a 25°C±1°C e analisados a cada sete dias, aqueles contaminados com fungos ou bactérias eram eliminados e aqueles em que ainda não havia crescimento de tripanossomatídeos e nem contaminação eram mantidos por aproximadamente um mês, sendo observados e repicados a cada sete dias para crescimento. Foram feitas alíquotas dos meios de cultura positivos e elas foram criopreservadas em temperatura de -70°C para melhor preservação e posteriores análises (CARVALHO et al., 1973; DE AVELAR *et al.*, 2011).

3.6.7 Extração de DNA das massas de cultura

O DNA das massas de cultura foi extraído utilizando o *PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen®) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante para extração de DNA de amostras de medula.

3.6.8 Análises moleculares

3.6.8.1 Fragmento de ponta de orelha

Para as amostras de pele foi utilizada a técnica de PCR-RFLP utilizando os alvos ITS1 e hsp70 para a identificação da espécie de *Leishmania* presente nos cães. Para o alvo ITS1 utilizaram-se os *primers* LITSR – 5' CTG GAT CAT TTTCCG ATG 3' / L5.8S – 5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3' (EL TAIL *et al.*, 2000). O volume final para a PCR foi de 25µL (5µL de DNA molde, 2.5µL de tampão, 0,5µL de dNTPs, 1.25µL de DMSO, 1.25µL de *primer forward*, 1.25µL de *primer reverse*, 0.75µL de MgCl₂, 0.25µL de Taq polimerase e 12.25µL de água). O protocolo usado no termociclador para a amplificação do DNA molde foi desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; a extensão final foi a 72°C por 10 minutos. Para a RFLP, 10µL dos produtos da PCR juntamente com 1µL da enzima HaeIII, 0.15 µL de BSA, 1.5µL de tampão e 2.35µL água, foram mantidos a temperatura de 37°C durante 2 horas. Após este período de incubação, os resultados foram observados em gel de agarose a 2%. Como controles positivos utilizaram-se cepas referências para *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

Para o alvo hsp70 utilizaram-se os *primers* hsp70sent 5'- GAC GGT GCC TGC CTA CTT CAA -3' / hsp70ant- 5'- CCG CCC ATG CTC TGG TAC ATC -3' (GARCIA *et al.*, 2004) e a enzima HaeIII. A PCR é realizada com um volume final de 25µL (5µL do DNA molde, 2.5µL de tampão 5x, 0.5µL de dNTPs (10Mm), 1.25µL de DMSO, 1µL de *primer forward*, 1µL de *primer reverse*, 0.75µL de MgCl₂, 0.25µL de Taq polimerase e 12.75µL de água). A amplificação do DNA molde no termociclador segue o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 35 repetições de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto 30 segundos; a extensão final é a 72°C por 10 minutos. O mesmo protocolo do ITS1 para a HaeIII se repetiu aqui.

3.6.8.2 Pulgas

As pulgas coletadas para as análises moleculares foram processadas individualmente. As amostras de DNA das pulgas foram submetidas ao alvo SSU rDNA (região: v7v8), *primers* 609F 5' – CAC CCG CGG TAA TTC CAG C – 3' / 5' – CTG AGA CTG TAA CCT CAA – 3' (BORGHESAN *et al.*, 2013). Para o v7v8 o volume final é de 25µL (5µL do DNA molde, 2.5µL de tampão, 0.75µL de MgCl₂, 1µL de dNTPs, 1µL de *primer forward*, 1µL de *primer reverse*, 0.14µL de Taq polimerase e 13.61µL de água) e para a amplificação do DNA molde é utilizado o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos; a extensão final é a 72°C por 10 minutos. A leitura do resultado foi feita a partir de gel de agarose a 1%. Foram utilizados como controles positivos cepas referências para *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) e *Blechnomonas ayalai*.

3.6.8.3 Isolados das peles e das pulgas

Para os isolados na cultura, tanto de pele quanto de pulgas, os alvos escolhidos para a realização das análises moleculares foram v7v8, ITS1 e hsp70, seguindo os protocolos citados anteriormente. Após a realização da técnica de PCR-RFLP, as amostras foram enviadas para sequenciamento.

3.6.8.4 RFLP

Após a PCR convencional, as amostras positivas de pele e de cultura para os alvos ITS1 e hsp70 foram submetidas à técnica de RFLP. Para esta técnica, em um novo tubo de 0,5mL, 10µL dos produtos da PCR juntamente com 1µL da enzima HaeIII, 0.15 µL de BSA, 1.5µL de tampão e 2.35µL água, são mantidos à temperatura de 37°C durante 2 horas. Após este período de incubação, os resultados foram observados em gel de agarose a 2%. Os perfis de restrição obtidos pela digestão da enzima foram comparados com o padrão obtido pela digestão do

produto de PCR-RFLP de cepas referências de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), *Leptomonas collosoma* (COLPROT073), *Crithidia fasciculata* (COLPROT 048), *Herpetomonas samuelpessoai* (COLPROT 067) e *Endotrypanum monterogeii* (COLPROT 151) e *Blechnomonas ayalai*.

3.6.8.5 Sequenciamento e análise filogenética

As análises de sequenciamento foram realizadas na Plataforma de Sequenciamento do Instituto René Rachou, FIOCRUZ Minas. Para o envio, os produtos de PCR foram purificados com o QIAquick PCR Purification Kit - QIAGEN®, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

Após a obtenção dos resultados do sequenciamento, as sequências obtidas foram analisadas quanto à qualidade, através dos eletroferogramas, e os *contigs* foram formados com o auxílio do software MEGA X. Posteriormente, as sequências foram submetidas à procura de homologia com as sequências depositadas em bancos de dados, utilizando o software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Após a análise de identidade, a classificação das sequências foi feita de acordo com o grau de similaridade com os dados já depositados no *Genbank*.

4 Resultados

4.1 Estudo 1

4.1.1 Sorologia

Foi realizado o teste sorológico DPP (Bio-Manguinhos®-Fiocruz/MS, Brasil) em 627 cães pertencentes às 17 residências participantes do estudo, as quais possuem elevado número de animais (Figura 1) e estão localizadas em áreas endêmicas para LVC.



Figura 1 - Ambiente das residências incluídas no estudo: elevado número de cães.

Dos 627 animais testados no DPP (Bio-Manguinhos®-Fiocruz/MS, Brasil), 52.8% (331/627) foram negativos; 13.6% (85/627) foram positivos no DPP, mas foram negativos ELISA (IDEXX® Laboratories Inc. Westbrook, Maine, USA) não

confirmando a soropositividade e 33.6% (211/627) foram positivos no DPP e no ELISA (IDEXX® Laboratories Inc. Westbrook, Maine, USA), confirmando a soropositividade nos cães das 17 casas participantes (Tabela 2).

Os resultados das sorologias pertencentes à mesma cidade foram somados para melhor comparação dos dados e foi observado que não houve diferença estatística entre o número de animais soro reagentes para LVC das 17 residências nas nove cidades avaliadas ($p>0.001$).

Tabela 2 – Resultados dos testes sorológicos DPP e ELISA – os valores são a soma dos resultados das casas participantes de cada cidade.

DPP e ELISA por Cidade e Residências			
LOCAL	DPP -	DPP+ ELISA-	DPP+ ELISA+
R1 (Belo Horizonte)	56.8% (21)	16.2% (6)	27.0% (10)
R2/R3/R4 (Contagem)	48.0% (36)	18.7% (14)	33.3% (25)
R5/R6 (Divinópolis)	50.0% (22)	25.0% (11)	25.0% (11)
R7/R8/R9 (Esmeraldas)	50.0% (36)	20.8% (15)	29.2% (21)
R10/R11/R12 (Ibirité)	62.7% (47)	5.3% (4)	32.0% (24)
R13 (Igarapé)	59.3% (32)	1.9% (1)	38.9% (21)
R14/R15 (Ipatinga)	45.6% (31)	13.2% (9)	41.2% (28)
R16 (Ribeirão das Neves)	50.5% (48)	11.6% (11)	37.9% (36)
R17 (Santa Luzia)	54.2% (58)	13.1% (14)	32.7% (35)
Total	52.8% (331)	13.6% (85)	33.6% (211)

4.1.2 Biologia molecular – *Leishmania* spp.

Dos 211 cães soro reagentes no DPP e confirmados no ELISA, 118 apresentavam ausência de sinais clínicos ou os apresentava de forma branda. Assim, foram coletadas amostras destes animais para a realização de exames moleculares para confirmação da infecção. As positivities encontradas nas amostras foram de 44.1% (52/118) para pele, 40.0% (46/116) para medula e 52.3% (34/65) para linfonodo, sendo esta a amostra que apresentou maior positividade.

Ao comparar as amostras, encontrou-se que pele e linfonodo possuem uma complementariedade de 31.3%, mostrando ser uma boa combinação para o diagnóstico da LVC, seguido pelas combinações linfonodo e medula de 24.2% e pele e medula de 16.8%.

Para confirmar as espécies de *Leishmania* presentes nas infecções dos cães sem sinais clínicos ou com sinais leves, realizou-se a PCR-RFLP. Dos cães avaliados, 66.1% (78/118) foram positivos para *L. infantum* e 5.9% (7/118) foram positivos para *L. amazonensis* (Figura 2) em amostras de pele, medula e linfonodo (Tabela 3). E um cão apresentou coinfeção para ambas as espécies de *Leishmania*, sendo positivo na amostra de pele para *L. infantum* e na amostra de linfonodo para *L. amazonensis*. Os cães positivos para *L. amazonensis* pertenciam a quatro residências: R16 (Ribeirão das Neves) com 3.3% (4/28), R9 (Esmeraldas) com 1.6% (2/11), R10 (Ibirité) com 0.8% (1/8) e R17 (Santa Luzia) com 0.8% (1/17), onde foi detectado o cão com coinfeção.

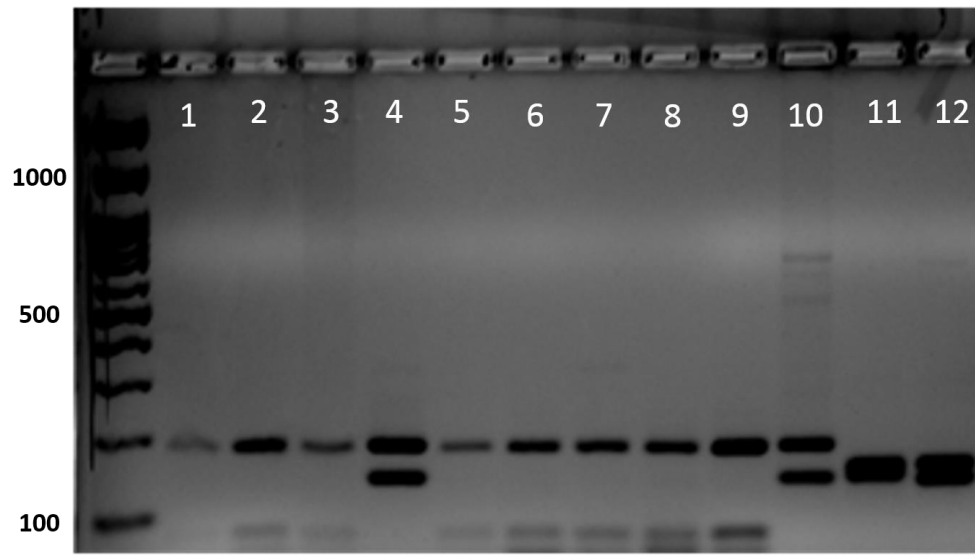


Figura 2 - Gel de Agarose 2% para o diagnóstico de *Leishmania* sp. em amostras de medula canina. Para a PCR-RFLP foi utilizado o *primer* ITS1 e a enzima *HaeIII*. As amostras 1-3 e 5-8 foram positivas para *L. infantum*. A amostra 4 foi positiva para *L. amazonensis*. Controles: 9 – *Leishmania infantum*; 10 – *L. amazonensis*; 11 – *L. braziliensis*; 12 – *L. guyanensis*.

Tabela 3 – PCR-RFLP utilizando o alvo ITS1 e a enzima HaeIII.

Tecido/Espécie	Resultado		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total
Pele/ <i>L. infantum</i>	72 (61.0)	46 (39.0)	118
Medula/ <i>L. infantum</i>	71 (61.2)	45 (38.9)	116
Linfonodo/ <i>L. infantum</i>	32 (49.2)	33 (50.8)	65
Pele/ <i>L. amazonensis</i>	112 (94.9)	6 (5.1)	118
Medula/ <i>L. amazonensis</i>	115 (99.1)	1 (0.9)	116
Linfonodo/ <i>L. amazonensis</i>	64 (98.5)	1 (1.5)	65

4.1.3 Avaliação clínica

Dos 211 cães soro reagentes no DPP e no ELISA, 118 foram selecionados para uma inspeção clínica mais criteriosa. As manifestações clínicas mais observadas foram linfadenomegalia 81.4% (96/118), descamação e hiperqueratose 71.2% (84/118) e onicogribose 51.7% (61/118), os sinais clínicos encontrados nos cães estão descritos no Gráfico 1.

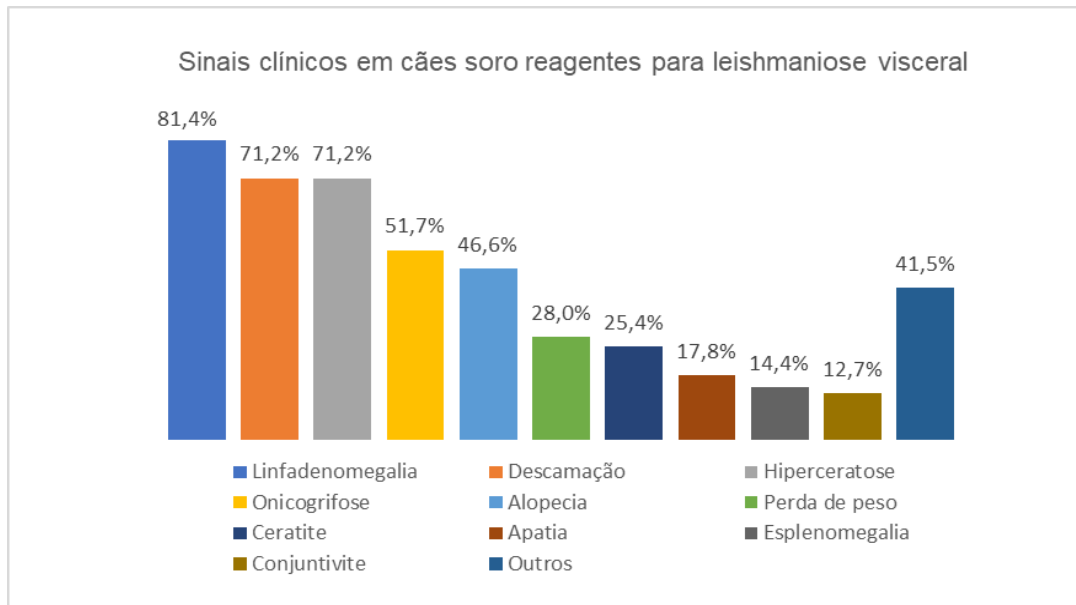


Gráfico 1 – Frequência de sinais clínicos observados nos 118 cães soro reagentes para Leishmaniose Visceral. Em “Outros” há as manifestações com frequências abaixo de 10%, sendo elas, seborreia, nódulo, úlcera, claudicação, epistaxe, uveíte, piodermite, atrofia muscular, diarreia, artrite e hepatomegalia.

Ao avaliar o escore clínico entre o grupo dos cães negativos e o grupo dos cães positivos na PCR, verificou-se que o grupo de animais positivos exibiu manifestações clínicas mais intensas do que o grupo negativo ($p < 0001$) (Gráfico 2), embora ainda fossem sinais clínicos menos intensos com relação aos cães confirmados positivos somente através da sorologia.

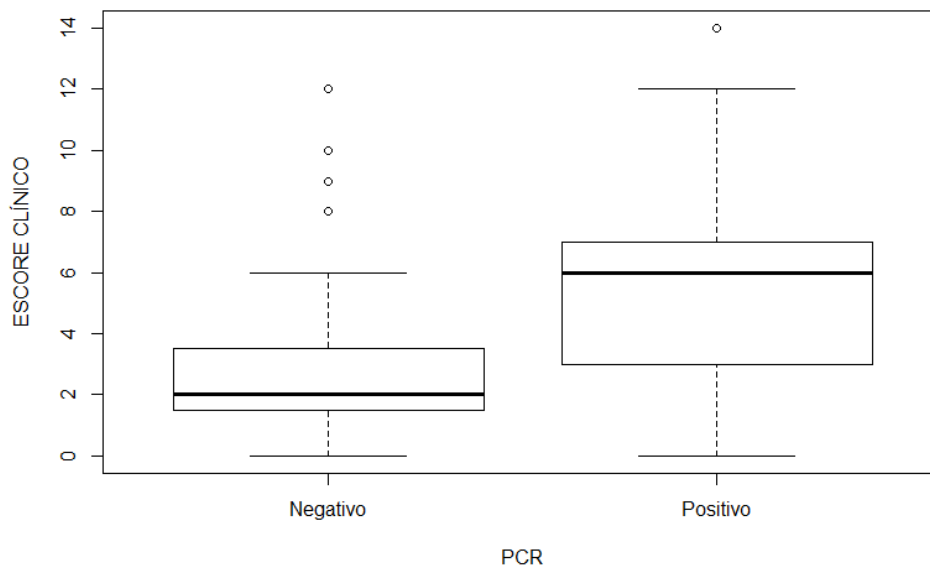


Gráfico 2 – Cães soro reagentes para LV divididos em dois grupos: 1 – negativos na PCR; 2 – positivos na PCR. Os animais positivos para *Leishmania* apresentaram sinais clínicos mais intensos em relação aos animais negativos ($p < 0.001$).

Os sinais clínicos mais observados nos cães infectados por *L. amazonensis* foram linfadenomegalia 85.7% (6/7); descamação e onicogribose 71.4% (5/7); hiperqueratose 57.1% (4/7); alopecia 42.9% (3/7); esplenomegalia 28.6% (2/7); seborreia, claudicação, artrite, ceratite, nódulos e úlceras foram encontrados em 14.3% (1/7) dos animais (Gráfico 3).

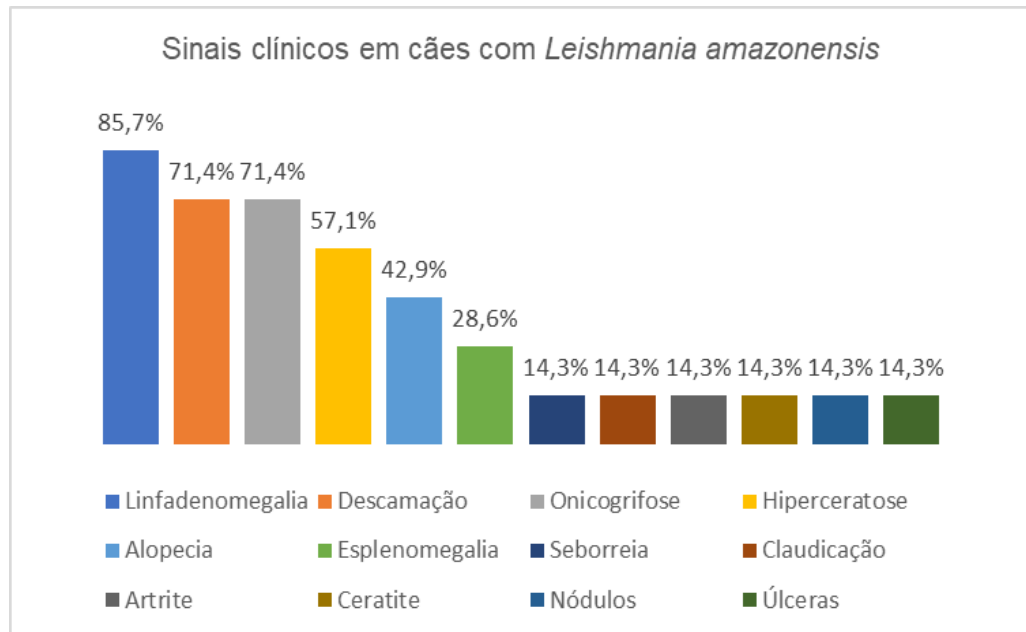


Gráfico 3 – Manifestações clínicas observadas em cães positivos na PCR-RFLP para *Leishmania amazonensis*, utilizando o primer ITS1 e a enzima de restrição HaeIII.

Os sinais clínicos observados no cão coinfectado com *L. infantum* e *L. amazonensis* foram onicogrifose e linfadenomegalia.

4.1.4 Patologia clínica

Nos exames hematológicos e bioquímicos, foram encontradas alterações que normalmente são detectadas em infecção por *L. infantum* como hiperproteinemia em 62.3% (38/61), redução na relação albumina/globulina em 52.5% (32/61), aumento da enzima hepática alanina aminotransferase (ALT) em 19.7% (12/61), azotemia em 13.1% (8/61), anemia em 42.6% (26/61) e trombocitopenia em 36.1% (22/61) dos cães.

Dos cães diagnosticados com *L. amazonensis*, 14.3% (1/7) apresentaram hiperproteinemia e redução na relação albumina/globulina, 28.6% (2/7) aumento da enzima hepática alanina aminotransferase (ALT) e 42.9% (3/7) apresentaram

trombocitose. O cão coinfectado com *L. infantum* e *L. amazonensis* apresentou hiperproteinemia, trombocitopenia e redução da enzima ALT.

4.2 Estudo 2

4.2.1 Biologia Molecular

Dos 159 animais soropositivos para LV submetidos a PCR para a detecção de DNA de *Leishmania* spp. 92.5% (147/159) foram positivos. Destes 147 animais positivos para *Leishmania* spp., 44.2% (65/147) estavam coinfectados por algum dos três hemoparasitos investigados, *Babesia* spp., *E. canis* e/ou *A. platys*.

Ao avaliar a coinfeção entre *Leishmania* spp. e somente um hemoparasito foram observados os seguintes resultados: *Leishmania* spp. e *Babesia* spp. 36.8% (54/147), *Leishmania* spp. e *A. platys* 10.9% (16/147) e não foram detectados cães coinfectados com *Leishmania* spp. e *E. canis* (Tabela 4).

Quando se avaliou a infecção entre *Leishmania* spp. e mais de um hemoparasito foram identificados 2.7% (4/147) infectados por *Leishmania* spp., *Babesia* spp. e *E. canis*, 2.0% (3/147) por *Leishmania* spp., *Babesia* spp. e *A. platys* e 1.4% (2/147) infectados por *Leishmania* spp., *E. canis* e *A. platys* (Tabela 5).

Tabela 4 – Cães coinfectados com um hemoparasito (*Babesia* spp., *Ehrlichia canis* ou *Anaplasma platys*) e *Leishmania* spp.

Cães coinfectados por <i>Leishmania</i> spp. e somente um hemoparasito			
	<i>Babesia</i> sp.	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Anaplasma platys</i>
<i>Leishmania</i> spp.	36.8% (54/147)	***	10.9% (16/147)

*** Não foram diagnosticados cães coinfectados com *Leishmania* spp. e *Ehrlichia canis*.

Tabela 5 – Cães coinfectados com dois hemoparasitos (*Babesia spp.*, *Ehrlichia canis* ou *Anaplasma platys*) e *Leishmania spp.*

Cães coinfectados por <i>Leishmania spp.</i> e mais de um hemoparasito			
	<i>Babesia sp.</i> e <i>E. canis</i>	<i>Babesia sp.</i> e <i>A. platys</i>	<i>E. canis</i> e <i>A. platys</i>
<i>Leishmania spp.</i>	2.7% (4/147)	2.0% (3/147)	1.4% (2/147)

4.3 Estudo 3

4.3.1 Inspeção clínica

4.3.1.1 Itabirito – Sinais clínicos

Na cidade de Itabirito foram coletadas amostras de onze cães. Os sinais clínicos mais observados nos cães soro reagentes (Figura 3) da cidade de Itabirito foram linfadenomegalia 90,9% (10/11), onicogrifose 81,8% (9/11), secreção ocular 72,7% (8/11) e alteração em ponta de orelha, descamação, mucosa pálida e alopecia, 63,6% (7/11). As demais alterações clínicas observadas estão descritas na tabela 6.



Figura 3 – Cão soro reagente para LV da cidade de Itabirito com sinais clínicos.

Tabela 6 – Sinais clínicos observados em cães soro reagentes para LV em Itabirito, Minas Gerais.

Sinais clínicos - Cães - Itabirito	
Linfadenomegalia	91.0% (10/11)
Onicogrifose	81.8% (9/11)
Secreção ocular	72.7% (8/11)
Alteração em ponta de orelha	63.6% (7/11)
Descamação	63.6% (7/11)
Mucosa pálida	63.6% (7/11)
Alopecia	63.6% (7/11)
Hiperqueratose	54.5% (6/11)
Feridas	27.3% (3/11)
Conjuntivite	27.3% (3/11)
Opacidade córnea	9.1% (1/11)
Paresia de posterior	0
Sem sinais clínicos	0

4.3.1.2 Itabirito – Infestação de pulgas

Foram coletadas 74 pulgas e a porcentagem de cães infestados foi de 81.9% (9/11). As taxas de infestações nestes animais foram de 22.2% (2/9) com infestação leve (1 a 3 pulgas), 22.2% (2/9) com infestação moderada (4 a 10 pulgas) e 55.6% (5/9) com infestação intensa (acima de 10 pulgas). Os outros dois cães não apresentavam infestação por pulgas.

4.3.1.3 Sabará – Sinais clínicos

Na cidade de Sabará foram coletadas amostras de 126 cães. Os sinais clínicos mais observados nos cães soro reagentes (Figura 4) da cidade de Sabará foram descamação 72.2% (91/126), feridas 71.4% (90/126), onicogrifose 69.0% (87/126), linfadenomegalia 68.2% (86/126), alteração em ponta de orelha 67.5%

(85/126) e hiperqueratose 59.5% (75/126). As demais alterações clínicas observadas estão descritas na tabela 7.



Figura 4 – Cão soro reagente para LV da cidade de Sabará com sinais clínicos.

Tabela 7 – Sinais clínicos observados em cães soro reagentes para LV em Sabará, Minas Gerais.

Sinais clínicos - Cães - Sabará	
Descamação	72.2% (91/126)
Feridas	71.4% (90/126)
Onicogribose	69.0% (87/126)
Linfadenomegalia	68.2% (86/126)
Alteração em ponta de orelha	67.5% (85/126)
Hiperqueratose	59.5% (75/126)
Mucosa pálida	43.7% (55/126)
Alopecia	41.3% (52/126)
Secreção ocular	40.5% (51/126)
Conjuntivite	39.7% (50/126)
Opacidade córnea	34.9% (44/126)
Paresia de posterior	0.8% (1/126)
Sem sinais clínicos	0

4.3.1.4 Sabará – Infestação de pulgas

O total de pulgas coletadas foi de 872 e a porcentagem de cães infestados foi de 67.7% (85/126). As taxas de infestações nestes animais foram 11,76% (10/85) com infestação leve (1 a 3 pulgas), 28.24% (24/85) com infestação moderada (4 a 10 pulgas) e 60% (51/85) com infestação intensa (acima de 10 pulgas).

4.3.2 Análises moleculares

4.3.2.1 PCR-RFLP Peles

Foram analisados os fragmentos de pele dos 11 cães de Itabirito e após a realização da técnica de PCR-RFLP com o alvo hsp70, 72.7% (8/11) apresentaram *amplicon* na PCR, confirmando a positividade para *L. infantum* na RFLP.

Das 126 amostras de pele dos cães de Sabará, 40.5% (51/126) foram positivas para o alvo ITS1, destas, 39.7% (50/126) confirmaram a positividade para *L. infantum* na RFLP. Para o alvo hsp70, 46.0% (58/126) foram positivas e, destas, 37.3% (47/126) confirmaram a positividade para *L. infantum* com a enzima HaeIII na RFLP (Figura 5).

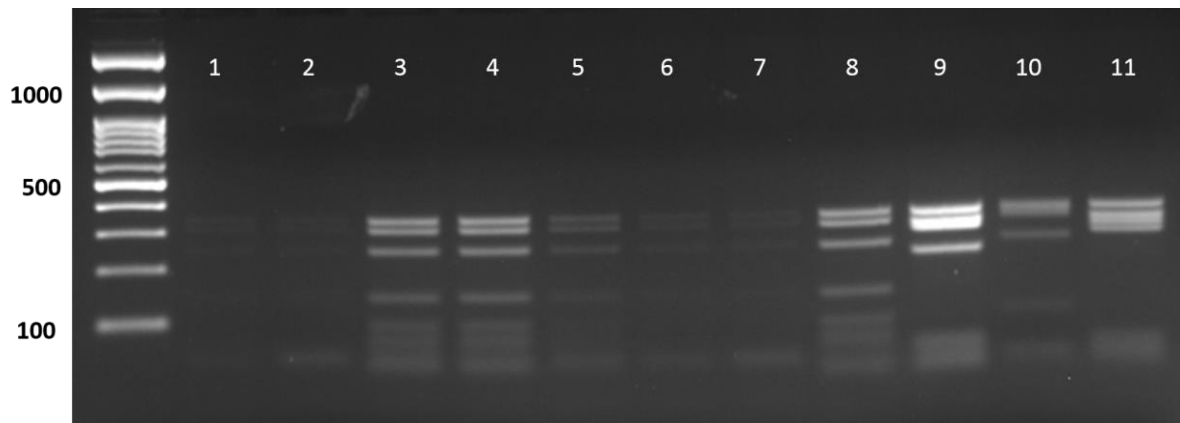


Figura 5 – Gel de Agarose a 2% - Amostras de cultura de pele de cães soro reagentes para leishmaniose visceral. PCR-RFLP: Alvo utilizado hsp70 e enzima HaeIII. Amostras: 1-7 – padrões semelhantes ao padrão de *Leishmania infantum*. Controles: 8 – *Leishmania infantum*; 9 – *Leishmania braziliensis*; 10 – *Leishmania amazonensis*; 11 – *Leishmania guyanensis*.

4.3.2.2 PCR Pulgas

Das 39 pulgas de Itabirito analisadas para o alvo v7v8, nenhuma foi positiva na PCR.

Das 872 pulgas coletadas em Sabará, 12.7% (111/872) foram positivas para o alvo v7v8 (Figura 6). Destas amostras positivas, cinco foram enviadas para sequenciamento e, após as análises, as amostras apresentaram similaridade com *Blechromonas* sp. (98.83% de identidade com amostras de sequência isolada de *Ctenocephalides canis* da República Tcheca – KF054127).

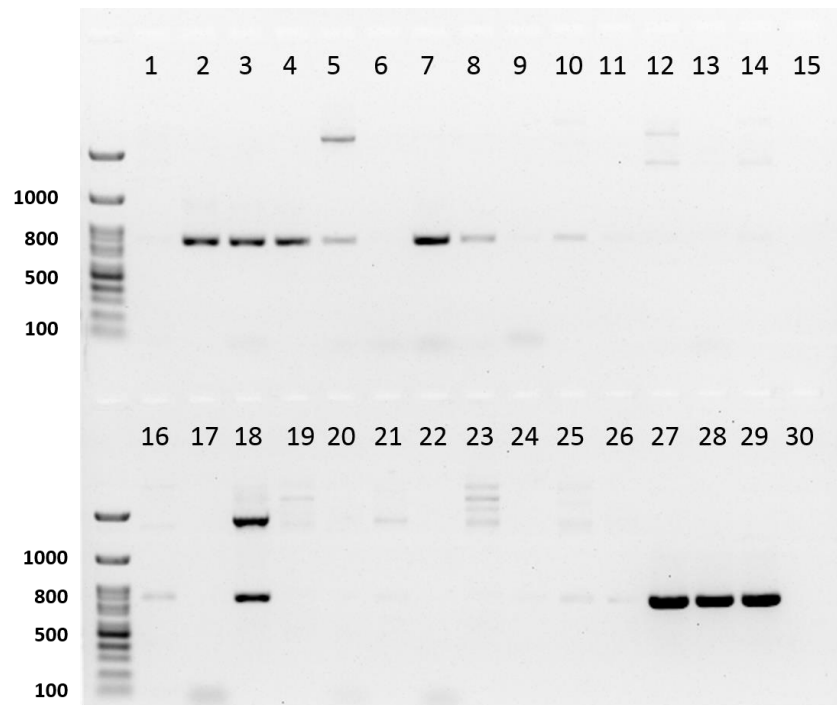


Figura 6 – Gel de agarose a 1% com amostras de pulgas retiradas de cães soros reagentes para *Leishmania infantum*. PCR realizada com o alvo v7v8 - 1 a 26 amostras de pulgas; 27 a 29 controles positivos: *L. infantum*, *L. braziliensis* e *Blechromonas ayalai*, respectivamente; 30 – Controle Negativo. Amostras positivas: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 16 e 18.

4.3.2.3 Isolamento – Amostras de pele

Fragmento de pele dos 11 cães de Itabirito foram submetidos ao meio de cultura NNN/LIT e em 81.8% (9/11) das amostras houve crescimento de tripanossomatídeos. Após as análises moleculares utilizando os alvos ITS1 e hsp70 para a técnica de PCR-RFLP todas as amostras foram positivas para *L. infantum*.

Com relação aos fragmentos de pele dos cães de Sabará submetidos ao meio de cultura, houve crescimento de tripanossomatídeos em 27.0% (34/126). Após a realização da PCR-RFLP para os alvos ITS1 (Figura 7) e hsp70 (Figura 8), 94.1% (32/34) das amostras foram positivas para *L. infantum* e 5.9% (2/34) apresentaram *amplicons* com padrões diferentes para *L. infantum*.

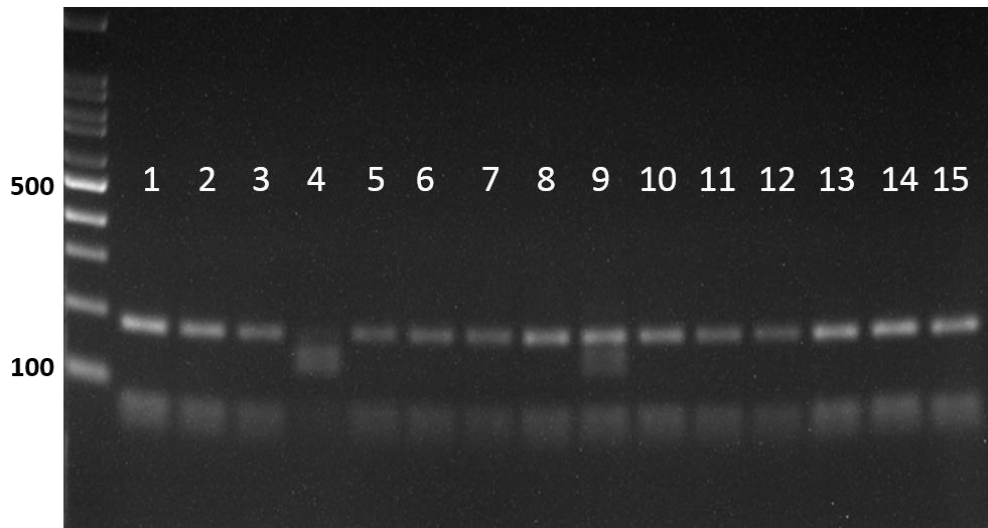


Figura 7 – Gel de Agarose a 2% - Amostras de cultura de pele de cães soros reagentes para leishmaniose visceral. PCR-RFLP: Alvo utilizado ITS1 e enzima HaeIII. Amostras: 1-3, 5-8; 9-15 – padrões semelhantes ao padrão de *Leishmania infantum*. Amostras: 4 e 9 – padrões inespecíficos.

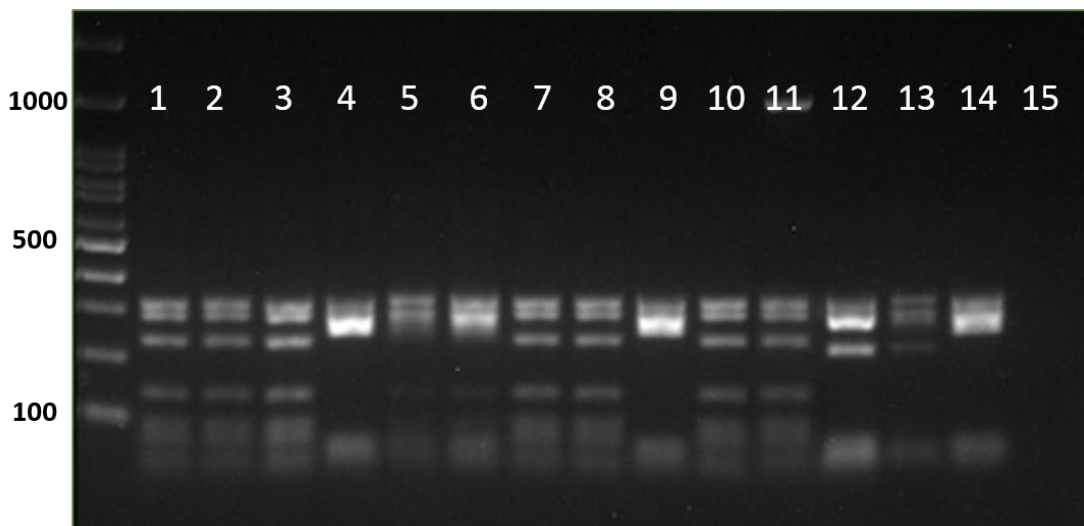


Figura 8 – Gel de Agarose a 2% - Amostras de cultura de pele de cães soros reagentes para leishmaniose visceral. PCR-RFLP: Alvo utilizado hsp70 e enzima HaeIII. Amostras: 1-3,5-8, 10 – padrões semelhantes ao padrão de *Leishmania infantum*. Amostras 4 e 9 – padrões semelhantes ao padrão de *Leishmania guyanensis*. Controles: 11 – *Leishmania infantum*; 12 – *Leishmania braziliensis*; 13 – *Leishmania amazonensis*; 14 – *Leishmania guyanensis*; 15 – Controle negativo.

Após as análises do sequenciamento do alvo hsp70 (Figura 9), as sequências das amostras com padrões diferentes de *L. infantum* mostraram similaridade de identidade com sequências de *L. guyanensis* (98.57% de identidade com sequência de amostra da cepa de *L. guyanensis* - MHOM/CR/2019/108-GML – ON075820).

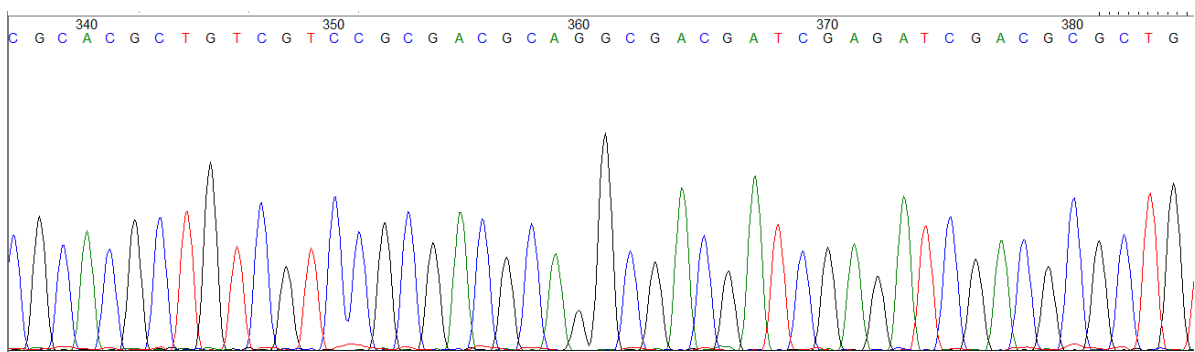


Figura 9 – Representação de parte do eletroferograma da sequência da amostra de isolado de tripanossomatídeo de pele de cão em meio de cultura NNN/LIT.

4.3.2.4 Isolamento – Amostras de pulga

Em relação às 9 amostras de *pools* de pulgas de Itabirito submetidas ao meio de cultura NNN/LIT, não foi isolado nenhum parasito e houve intensa contaminação das amostras com bactérias e fungos.

Das 85 amostras de *pools* de pulgas de Sabará, foram isolados tripanossomatídeos de uma amostra (Figura 10). Após a realização da PCR Convencional utilizando os alvos v7v8 (Figura 11) e da PCR-RFLP, utilizando os alvos ITS1 e o hsp70 (Figura 12), e, após sequenciamento e análises filogenéticas, as amostras apresentaram similaridade com *Blechnomonas* sp. (99.86% de identidade com amostras de sequência isolada de *C. felis felis* da República Tcheca – KF054133).

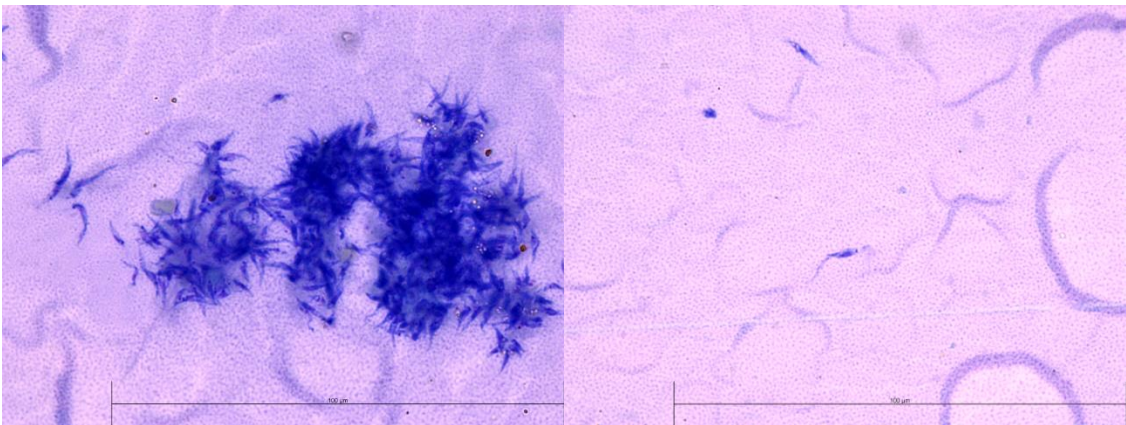


Figura 10 – Tripanossomatídeos isolados de pulgas coletadas de cães soro reagentes para leishmaniose visceral.

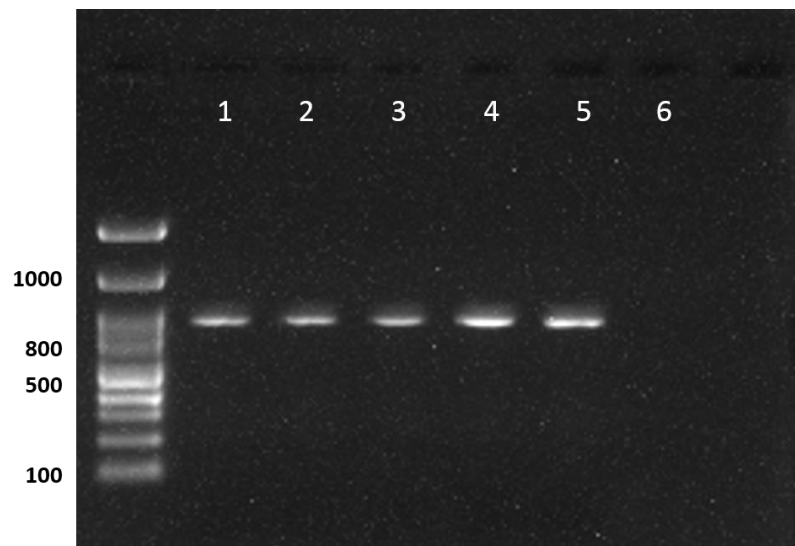


Figura 11 – Gel de agarose a 1%. Amostra de isolado de pulgas coletadas de cães com leishmaniose visceral. PCR convencional para o alvo v7v8. 1, 2 e 3 - amostras de isolado de pulga; 4 – *L. infantum*; 5 – *Blechomonas ayalai*; 6 – Controle Negativo.

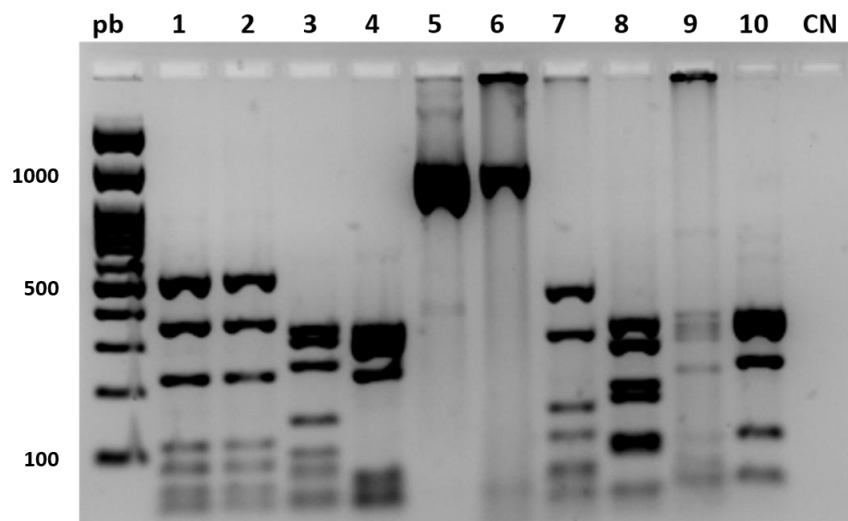


Figura 12 – Gel de agarose a 2%. Amostra de isolado de pulgas coletadas de cães com leishmaniose visceral. PCR-RFLP: alvo hsp70 e enzima HaeIII. 1 e 2- amostras de isolado de pulga; 3 – *L. infantum*; 4 – *L. braziliensis*; 5 – *L. amazonensis*; 6 - *L. guyanensis*; 7 – *Herpetomonas samuelpessoai* 8 – *Leptomonas collosoma*; 9 – *Crithidia fasciculata*; 10 - *Endotrypanum monterogeii*; CN – Controle Negativo.

5 Discussão

5.1 Estudo 1

A taxa de positividade encontrada nos cães deste estudo de 33.6% para leishmaniose visceral foi de até dez vezes maior do que já foi descrito em trabalhos anteriores envolvendo cães que vivem em domicílios (LOPES *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2020). Embora os animais sejam de cidades diferentes, todas as localidades se encontram em áreas endêmicas para LV. Os cães vivem em ambientes com elevado número de animais, em que há mais entrada do que saída de animais, pois pertencem a responsáveis acumuladores, que recolhem cães abandonados e errantes constantemente.

Ainda que sejam animais que recebam cuidados e atenção de seus responsáveis, não são realizadas medidas constantes de prevenção e controle para diversas doenças, dentre elas a LVC. Concomitante a isto, as residências, geralmente, localizadas em áreas com bastante matéria orgânica, matas próximas, árvores, terrenos baldios, facilitam a presença do vetor flebotomíneo. Além disso, os animais ficam principalmente na área externa das residências, favorecendo um maior contato com flebotomíneos, apresentando duas vezes mais chances de adquirirem a infecção (COURA-VITAL *et al.*, 2011). Assim, as condições ambientais e a abundância de fonte alimentar são fatores determinantes para o crescimento populacional do vetor, podendo tornar estes ambientes com elevado número de animais focos de dispersão dos parasitos para a vizinhança, tanto para os cães quanto para os humanos.

Entre 2014-2018, foram diagnosticados 1018 casos de leishmaniose visceral humana nas nove cidades estudadas (DataSUS). E sabe-se que os cães são os principais reservatórios urbanos da *L. infantum* e que os casos humanos estão associados aos casos caninos (COURA-VITAL *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2010). Além disso, aqueles animais que apresentam sinais clínicos mais intensos, principalmente na derme, tendem a possuir maior carga parasitária na pele, sendo uma significativa fonte de infecção para o flebotomíneo (GIUNCHETTI, *et al.*, 2006).

Na LVC, os sinais clínicos podem variar bastante, desde animais com ausência de sinais clínicos até cães muito debilitados, em estado crítico. Geralmente, as manifestações clínicas estão associadas à resposta imune do organismo de cada animal. Os cães deste estudo, embora apresentassem sinais clínicos, possuíam perfis de animais mais saudáveis, sem o acúmulo de sinais clínicos muito intensos em um único animal. As alterações mais encontradas são aquelas que muitas vezes não chamam tanto a atenção do responsável, como linfadenomegalia, descamação de pele e hiperqueratose, e estes são alguns dos sinais clínicos descritos como os mais comumente encontrados em cães com LV (PALTRINIERI *et al.*, 2010; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

Neste trabalho, os cães que apresentaram sinais clínicos mais intensos pertenciam ao grupo de animais positivos na sorologia. Dentre os animais analisados na PCR, o grupo de animais positivos também apresentavam mais sinais clínicos quando comparados com o grupo de animais negativos nesta técnica. Na literatura, são encontrados dois pontos de vista com relação a sinais clínicos e a carga parasitária na pele e em outros órgãos dos cães. Alguns estudos mostram que não há relação entre o escore clínico e a carga parasitária nos tecidos, tanto o animal com poucos sinais clínicos quanto aqueles com sinais clínicos mais acentuados possuem o parasito na pele em quantidades suficientes para serem detectados (BORJA *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2008; GIUNCHETTI *et al.*, 2008; XAVIER *et al.*, 2006), ou seja, ambos os animais possuem importância na epidemiologia da doença. Por outro lado, alguns autores demonstram que animais com sinais clínicos mais brandos possuem uma carga parasitária na pele bem mais baixa do que os animais com sinais clínicos intensos, tendo estes maior responsabilidade na manutenção da LV (DA COSTA-VAL *et al.*, 2007; GIUNCHETTI *et al.*, 2006; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

Dentre as amostras de tecidos coletadas, o linfonodo foi a que apresentou maior positividade para *L. infantum*, seguido por amostras de pele e medula. Este dado poderia ter sido ainda mais robusto, contudo, nem sempre é possível coletar

amostras deste tecido, principalmente, quando não estão palpáveis. Os dados de positividade do linfonodo corroboram com alguns autores (MAIA *et al.*, 2009; MARCELINO *et al.*, 2020), que descreveram o linfonodo como uma boa amostra para a detecção de DNA de *L. infantum*. Até mesmo em casos de tratamento dos animais, o linfonodo e a pele podem continuar positivos, sendo tecidos importantes para controlar a carga parasitária do cão (MANNA *et al.*, 2004). Além disso, já foi demonstrado que não há diferença na carga parasitária entre cães com sinais clínicos mais brandos e aqueles com sinais clínicos mais intensos (GIUNCHETTI *et al.*, 2008). Assim, deve-se ressaltar a importância de se utilizar mais de uma amostra para o diagnóstico molecular de LVC na rotina clínica, e a combinação melhor encontrada neste estudo foi pele e linfonodo.

Além de *L. infantum*, foi detectada a presença de *L. amazonensis* em tecidos de oito cães, e esta é a primeira descrição desta espécie em amostras de pele canina. Em outros relatos o tripanossomatídeo foi detectado em medula e linfonodo. *Leishmania amazonensis* já foi descrita em amostras caninas em Minas Gerais - estado no qual as cidades do estudo estão localizadas - (ALVES SOUZA *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2011; PAZ *et al.*, 2018; VALDIVIA *et al.*, 2017), contudo, nunca apresentando uma prevalência tão elevada como a encontrada neste trabalho, 6.6% (8/122). Esta coinfeção de *L. amazonensis* e *L. infantum* em cães corrobora com o encontrado por Alves-Souza *et al.* (2019). Estes resultados mostram o quanto são necessárias mais pesquisas sobre o verdadeiro papel do cão na epidemiologia das leishmanioses tegumentares, pois os cães podem estar atuando na manutenção destas enfermidades em locais nos quais há casos de LT humana, podendo levar a um aumento nos números de casos desta doença que é debilitante, leva a deformidades na pele e mucosa e que reflete tanto no campo social quanto econômico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Além disso, uma investigação acerca do vetor que está participando da transmissão deste parasito na área onde há os cães infectados deve ser realizada. Compreendendo que o principal vetor da *L. amazonensis* é *Lutzomyia* (*Nyssomyia*)

flaviscutellata (ARIAS *et al.*, 1987; WARD *et al.*, 1973) e que esta espécie de flebotomíneo é encontrada principalmente na floresta Amazônica e que não é antropofílica, sugere-se que investigações sobre qual é o vetor da *L. amazonensis* em cidades da região sudeste do Brasil sejam realizadas. Estes resultados mostram uma possível urbanização no ciclo da *L. amazonensis*, assim, gestores de saúde que atuam nas regiões deste estudo devem atentar-se a estes dados para investigar possíveis casos de LT humana na região, como também devem considerar os elevados números de cães com LV.

Outro aspecto importante são os sinais clínicos apresentados pelos oito cães positivos para *L. amazonensis*. Apesar de ter sido observado alguns sinais clínicos que são encontrados na LVC em alguns animais com *L. amazonensis*, estes eram bem mais brandos quando presentes, ou estavam ausentes, discordando de Tolezano *et al.* (2007). Esses dados são extremamente relevantes sugerindo que cães infectados com *L. amazonensis* podem soroconverter e apresentar reação cruzada nos testes sorológicos utilizados para o diagnóstico da LVC, mesmo com ausência de sinais clínicos ou apresentando sinais clínicos brandos. Os achados deste trabalho mostram a necessidade de investigar nos cães a presença de outras espécies, uma vez que alguns testes sorológicos apresentam reação cruzada entre as espécies de *Leishmania*, as quais podem apresentar entre 69% a 90% de homologia genética (VALE *et al.*, 2009). Ademais, *L. amazonensis* parece ser menos virulenta do que *L. infantum* para os cães, contudo, mais estudos são necessários para avaliar a virulência de cepas de *L. amazonensis* em cães do Brasil.

Além dos sinais clínicos, há os exames hematológicos que, juntamente com a inspeção clínica, norteiam o médico veterinário para definir o estadiamento clínico, o prognóstico e a evolução da doença no cão. Os cães deste estudo possuem um perfil mais saudável, pois embora não haja uma prevenção e controle efetivos da LVC pelos responsáveis, aqueles sinais clínicos mais aparentes geralmente são tratados e controlados. A maioria dos animais apresentou exames bioquímicos e hemograma dentro dos intervalos de referência, ou seja, sem alterações

significativas para a LVC, mas aquelas variações mais detectadas como, hiperproteinemia, queda na relação albumina/globulina, alterações em enzimas hepáticas, anemia e azotemia renal são comumente encontradas em animais infectados por *L. infantum* (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

Os exames bioquímicos e hemogramas dos cães infectados com *L. amazonensis* demonstraram hiperproteinemia, queda na relação albumina/globulina e trombocitose, assim como o cão coinfectado apresentou hiperproteinemia, trombocitopenia e alteração de enzima hepática. Mas, apesar dessas variações, os animais com *L. amazonensis* apresentavam menos alterações nos exames hematológicos e bioquímicos do que os cães com *L. infantum*. Apesar desses resultados, foram poucas as amostras de animais infectados com esta espécie de protozoário e na literatura não há informações sobre a patologia clínica em cães infectados com *L. amazonensis*, assim, mais investigações são necessárias para conhecer as reais alterações hematológicas causadas por este parasito em cães. Além disso, é importante salientar que os animais deste estudo são de abrigos com diferenças nas formas de manejo entre eles, sendo assim, fatores como nutrição, coinfecção com outros patógenos e estresse também podem interferir nestes resultados.

5.2 Estudo 2

Os hemoparasitos transmitidos por vetores possuem ampla distribuição geográfica na América Latina (MAGGI; KRÄMER, 2019). No Brasil, podem ser encontrados em todas as regiões por diversos fatores, como, o clima tropical, que favorece a presença dos vetores; o desmatamento ilegal, que leva ao desequilíbrio do ecossistema e à perda da biodiversidade (RANDOLPH, 2009; ROGERS; RANDOLPH, 2006); as dificuldades econômicas que grande parte da população enfrenta, o que dificulta a aquisição e a utilização de medidas de controle e prevenção de ectoparasitos e, conseqüentemente, dos hemoparasitos transmitidos por esses vetores. Além desses fatos, torna-se ainda mais difícil o controle de ectoparasitos, transmissores de patógenos e de endoparasitos levando em

consideração os ambientes de abrigos de animais com superlotação e cujos responsáveis não possuem condições financeiras para mantê-los.

A prevalência das hemoparasitoses causadas pela *Babesia* spp., *E. canis* e *A. platys* é bem variável no território brasileiro, estando muito associado à presença do carrapato vetor, das características do ambiente onde os animais estão inseridos e às características da população dos animais (DANTAS-TORRES *et al.*, 2021). Neste trabalho, a taxa de positividade de *Babesia* spp. foi de 36.8%, um valor elevado quando comparado com resultados de um trabalho realizado em duas áreas endêmicas para o hemoparasito, onde a prevalência foi de 14.0% (DANTAS-TORRES *et al.*, 2021). Geralmente as altas prevalências são observadas em estudos que buscam a exposição ao parasito através de sorologias, neste trabalho buscou-se a infecção a partir da detecção de DNA do parasito, o que torna ainda mais importante essa elevada prevalência de cães com *Babesia* spp. coinfectados por *L. infantum*. Em um trabalho realizado por De Sousa *et al.* (2013), ao investigar a presença de anticorpos do tipo IgG para *Babesia* spp. em cães soropositivos para *L. infantum*, foi encontrada uma taxa de positividade de 81.6%, enquanto ao realizar a PCR em amostras desses mesmos animais, apenas 3.3% foram positivos para *Babesia* spp.. Esta elevada taxa de positividade detectada neste trabalho pode estar associada aos aspectos relacionados aos ambientes nos quais os animais estão inseridos, como, elevado número de cães, ausência de controle adequado de ectoparasitos e entrada constante de novos animais sem cuidados prévios.

A coinfeção entre *L. infantum* e *Babesia* spp. pode ser um desafio no momento de instituir os tratamentos. Por exemplo, em ambas as infecções pode-se observar a presença de anemia, contudo, são anemias induzidas de formas diferentes, enquanto na infecção por *L. infantum* há uma anemia não regenerativa, na infecção por *Babesia* spp. há uma anemia hemolítica. Porém, durante uma coinfeção entre ambos os agentes não tem sido encontrado um sinergismo entre os dois tipos de anemia em animais adultos, apenas em cães jovens ou em infecções agudas (BEASLEY *et al.*, 2021). Além disso, a infecção por *Babesia* spp. leva a alguns sinais

clínicos semelhantes aos descritos em infecção por *L. infantum* como apatia, febre, perda de peso, palidez de mucosa (DANTAS-TORRES, 2008a). Talvez, na rotina clínica, o ideal seja que os médicos veterinários solicitem para ambos os patógenos o diagnóstico molecular, para identificar a real presença de ambos os agentes circulantes no paciente e não apenas a exposição, o que pode facilitar nas tomadas de decisão para a introdução dos tratamentos e para a determinação de prognóstico do paciente.

Em relação à *E. canis*, não foi encontrada coinfeção apenas por *Leishmania* spp. e *E. canis*, em todas as coinfeções, *E. canis* estava junto ou com *Babesia* spp. ou com *A. platys*. A taxa de positividade foi baixa quando comparada com outros trabalhos descritos na literatura, nos quais são descritas prevalências de 20.9%, 44.7%, 16.0% e 5.7% no Brasil (BORIN; CRIVELENTI; FERREIRA, 2009; COSTA-JR *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2006; LABARTHE *et al.*, 2003). Apesar de serem populações de animais diferentes da deste estudo, como, animais de área rural, animais de área urbana (residências) e animais atendidos em hospitais veterinários, esperava-se uma positividade mais alta nos animais pesquisados, pelo fato de estarem em ambientes mais permissivos para a presença do vetor. Contudo, os testes de diagnósticos utilizados também foram diferentes deste trabalho, como o ELISA, a RIFI e o esfregaço sanguíneo, o que altera as taxas de positivities, uma vez que os testes possuem diferentes valores de sensibilidade e de especificidade. Além disso, como neste trabalho foi utilizada técnica de biologia molecular, durante a fase crônica da infecção pode ser mais difícil detectar o parasito, pois estes tendem a estar em macrófagos no baço e não na circulação sanguínea (HARRUS *et al.*, 1998; HARRUS *et al.*, 2004). Na biologia molecular o resultado positivo confirma, mas o resultado negativo não exclui a infecção (BAXARIAS *et al.*, 2018). Como durante as fases crônicas das hemoparasitoses torna-se mais difícil a detecção dos agentes no sangue periférico, uma avaliação em série utilizando a técnica de PCR com amostras de sangue são recomendadas para aumentar a probabilidade de detecção dos parasitos (KIDD *et al.*, 2017), neste trabalho foi realizada apenas uma avaliação por animal.

Além disso, outro aspecto que merece discussão e que necessita de estudos para sua confirmação é que *E. canis* é um hemoparasito de células do sistema imune como macrófagos e monócitos, assim como *L. infantum*. Um questionamento sobre este fato é: será que quando estas células estão parasitadas com *L. infantum*, elas deixam de fagocitar *E. canis*? O que poderia justificar o fato da taxa de positividade para *E. canis* ter sido baixa nesses animais. Apesar disso, Attipa *et al.* (2018) encontraram que cães infectados com *E. canis* possuem 12.4 vezes mais chance de ter LVC clínica quando comparados com cães sem infecção por *E. canis*. Ademais, de acordo com Beasley *et al.* (2021), a internalização nos macrófagos pela *Ehrlichia* spp. pode inibir fortemente a resposta imune inata (Th1), favorecendo a sobrevivência de *L. infantum* dentro de células hospedeiras coinfectadas. Sendo assim, mais estudos são necessários para avaliar e conhecer mais sobre essas interações.

A prevalência de cães positivos para *A. platys* foi de 10.9%, um valor não muito distante de alguns trabalhos descritos na literatura que também utilizaram da técnica de PCR, nos quais as taxas encontradas foram de 15.46% no Mato Grosso do Sul (SOARES *et al.*, 2017), de 14.07% em Porto Alegre (LASTA *et al.*, 2013), e, em Minas Gerais, 22.8% em cães da cidade de Nanuque e de 18.5% em cães de Belo Horizonte (COSTA-JR *et al.*, 2013). *Anaplasma platys* e *E. canis* são dois hemoparasitos que geralmente são encontrados nas mesmas áreas e os mesmos cães costumam ter evidências de exposição ou de infecção (AKTAS *et al.*, 2015; CARDOSO *et al.*, 2010; DINIZ *et al.*, 2010). A infecção por este parasito tem mostrado reduzir as funções dos neutrófilos que estão associadas com a eliminação de patógenos intracelulares (BEASLEY *et al.*, 2021), o que sugere que a infecção por *A. platys* possa facilitar a manutenção da infecção por *L. infantum*.

Já é sabido que *E. canis* é transmitida pelo carrapato *R. sanguineus*, enquanto há fortes indícios de que *A. platys* também seja transmitida pelo mesmo vetor. A distribuição desse patógeno em cães sobrepõe com a distribuição do carrapato e a presença de DNA de *A. platys* em ninfas e adultos de *R. sanguineus* reforçam a

hipótese de que esse grupo de artrópode possa atuar como vetor (DANTAS-TORRES, 2008; RAMOS *et al.*, 2014).

Medidas de controle e prevenção desses agentes patogênicos em animais são muito relevantes, ainda mais quando se trata de animais como os deste trabalho, uma vez que são cães que fazem parte de abrigos onde existe um grande número de animais, o que pode contribuir para a presença e manutenção de agentes patogênicos circulantes (LIMA *et al.*, 2012; SOCCOL *et al.*, 2017). Além disso, muitas vezes os responsáveis pelos abrigos são pessoas com baixas condições financeiras, sendo incapazes de manter medidas preventivas individuais em seus animais, tanto para os endoparasitos quanto para os ectoparasitos (DA CUNHA *et al.*, 2017; PATRONEK, 1999). Situação essa de extrema importância, uma vez que *E. canis* e *A. platys* são agentes que já foram detectados em humanos (ARRAGA-ALVARADO *et al.*, 2014; MAGGI *et al.*, 2013; PEREZ *et al.*, 2006; PEREZ; RIKIHISA; WEN, 1996). Esta proximidade que há entre humanos e cães e a possibilidade de infestação por *R. sanguineus* em ambos, como já registrado no Brasil (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006; LOULY *et al.*, 2006), constitui uma possibilidade de fator de risco para a infecção humana por *E. canis* e por *A. platys*. Assim, esses ambientes com elevado número de animais, onde a possibilidade de presença de patógenos e de suas transmissões são grandes, podem servir de foco para a manutenção e a distribuição desses agentes.

No Brasil, o carrapato que mais está envolvido na transmissão de hemoparasitos para os cães pertencem à espécie *Rhipicephalus sanguineus*, contudo, neste trabalho não foi avaliada a presença de infestação por ectoparasitos nos animais. Sabe-se que nos carrapatos *R. sanguineus* infectados com *Babesia* spp. pode ocorrer tanto a transmissão transtadial quanto a transmissão transovariana, o que facilita a disseminação deste protozoário das fêmeas ingurgitadas para a sua prole, gerando um número grande de carrapatos infectados no ambiente (O'DWYER, MASSARD, 2002; TRAPP *et al.*, 2006). Essa transmissão ainda não foi confirmada em *E. canis* e *A. platys*. Este dado pode também pode justificar o fato de neste

trabalho ter havido um maior número de cães positivos para *Babesia* spp. do que para *E. canis* e *A. platys*.

Apesar de não ter sido um dos objetivos deste trabalho avaliar os sinais clínicos dos animais participantes, durante as coletas das amostras foi possível observar algumas alterações clínicas que costumam ser descritas em infecções por *Leishmania* spp., como, perda de peso, apatia e onicogribose (BAXARIAS *et al.*, 2018). Essas múltiplas infecções com dois ou mais parasitos podem dificultar o diagnóstico final, podem gerar quadros mais graves e podem dificultar uma resposta favorável a um possível tratamento nos indivíduos infectados (ALLISON; LITTLE, 2013; DE TOMMASI *et al.*, 2013; ROJAS *et al.*, 2014). Em um trabalho realizado por MEKUZAS *et al.* (2009), cães coinfectados por *E. canis* e *L. infantum* apresentaram um aumento dos sinais clínicos, sugerindo que a coinfeção está associada com uma patogenia sinérgica entre ambos os patógenos avaliados. Este dado levanta outra hipótese com relação a possibilidade de esses animais coinfectados apresentarem maior potencial de atuação como reservatórios, por possuírem esse sinergismo das infecções e, conseqüentemente, poderem apresentar mais sinais clínicos. Pois já é sabido que animais que geralmente apresentam mais sinais clínicos na infecção por *L. infantum*, tendem a ter maior carga parasitária na pele e atuarem melhor como reservatórios do parasito (GIUNCHETTI *et al.*, 2008). Mais estudos de coinfeções entre *L. infantum* e os hemoparasitos mais comumente encontrados em cães são necessários para que se conheça mais sobre a história natural dessas coinfeções nesses animais. Para isso, o ideal é que seja feito um desenho experimental adequado e um estudo mais controlado, com grupos homogêneos para cada tipo de coinfeção. Neste estudo isto foi um fator limitante, tendo em vista que os animais são manejados de maneiras muito heterogêneas, alimentação, número de animais por abrigo, situações diferentes de estresse, entre outras.

Os cães são considerados como exímios sentinelas para a detecção e para a caracterização de diferentes doenças zoonóticas, e a identificação correta desses

agentes nesses animais pode ajudar os cães afetados com a infecção, para que sejam introduzidas medidas de prevenção, controle e tratamentos adequados. Além disso, também pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção caso aconteça o aparecimento dessas doenças em humanos (AMUSATEGUI *et al.*, 2008; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2006). Por isso a importância de sempre atentar-se para que os animais de companhia, principalmente os cães que possuem uma proximidade tão grande com o ser humano, sejam sempre acompanhados por médicos veterinários, realizando exames de rotina, exames físicos, hemogramas e bioquímicos.

A taxa de positividade para *Babesia* spp. e para *Leishmania infantum* foi elevada, mostrando que esses ambientes com grande número de animais, principalmente de responsáveis que recolhem muitos animais e têm dificuldade em doá-los, são relevantes para a manutenção e dispersão desses patógenos. Inclusive, considerando que são agentes transmitidos por vetores, facilita ainda mais a contaminação tanto de animais que convivem no mesmo ambiente quanto de animais de áreas vizinhas.

Tem-se visto um aumento no número de patógenos circulantes em animais e em humanos com o passar dos anos. Com a proximidade dos cães com o homem deve-se manter a atenção aos sinais da possível presença desses parasitos nos animais e à presença de vetores, como os carrapatos e as pulgas. Além disso, uma vez que patógenos emergentes podem, eventualmente, ser identificados causando infecção em hospedeiros vertebrados, é importante que haja uma vigilância com relação à circulação desses agentes.

5.3 Estudo 3

A leishmaniose visceral continua sendo uma doença de grande importância, no Brasil, pelo fato de ainda haver elevados números de casos caninos e humanos. Estar atento à epidemiologia da doença em áreas endêmicas e à relação parasito-hospedeiro é extremamente relevante para que medidas mais

efetivas de prevenção e controle sejam realizadas em todo o ciclo epidemiológico da doença, ambiente, hospedeiro e vetor.

O principal vetor da *Leishmania infantum* no Brasil é o flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*. O flebotomíneo da espécie *Lutzomyia cruzi* também é um vetor descrito, mas não apresenta distribuição em todo o território nacional. Além dessas duas espécies, outras vêm sendo incriminadas como permissivas para a infecção por *L. infantum*, como, por exemplo, *Lutzomyia migonei* e *Pintomyia fischeri* (GALVIS-OVALLOS *et al.*, 2021; GUIMARÃES *et al.*, 2016; RÊGO *et al.*, 2020). Contudo, no ambiente, apenas 0.5% dos flebotomíneos apresentam infecção por *L. infantum*, mostrando uma baixa taxa de positividade em áreas endêmicas para a doença (MONTROYA-LERMA *et al.*, 2003). Além disso, uma relação positiva tem sido observada com relação a cães soropositivos para LV e infestações por pulgas (PAZ *et al.*, 2010a), o que foi também observado neste trabalho, no qual todos os cães eram soropositivos para LV e mais da metade apresentava infestação por pulgas.

Na tentativa de entender se a pulga faz parte, de alguma forma, do ciclo da doença, foi utilizado o alvo v7v8 recomendado para identificar parasitos da família Trypanosomatidae (VOTÝPKA *et al.*, 2013) e foi constatado que 12.7% das pulgas foram positivas nos testes, uma taxa de positividade para tripanossomatídeos maior do que a observada em flebotomíneos com *L. infantum*. Entretanto, ao serem analisadas através da técnica de sequenciamento, foi detectada a presença do gênero de tripanossomatídeo monoxênico *Blechnomonas* e não *Leishmania*. Este resultado sugere que, provavelmente, as pulgas não tenham participação no ciclo da leishmaniose visceral canina. Enfatiza-se aqui que, embora não tenha sido detectado DNA de *Leishmania* nas pulgas analisadas, esta é a primeira descrição de tripanossomatídeos do gênero *Blechnomonas* em pulgas no Brasil.

A partir do momento em que foi observada a presença de tripanossomatídeos nas pulgas da espécie *Ctenocephalides felis felis* - espécie mais encontrada parasitando cães no Brasil - abriu-se um leque de questionamentos que ainda

precisam de mais investigações para serem respondidos. As pulgas *C. felis felis* e os cães apresentam uma relação parasito-hospedeiro muito bem estabelecida, o que pode levar a uma relação mais próxima dos cães com o tripanossomatídeo encontrado nesse ectoparasito.

Na literatura, há relato sobre a produção de resposta imune-humoral em primatas não-humanos infectados com uma espécie de tripanossomatídeo monoxênico (DARIO *et al.*, 2021), sendo assim, ao ingerir as pulgas e ter contato com esses parasitos, pode ser que haja a produção de uma resposta imune que pode estar reagindo aos testes sorológicos preconizados para o diagnóstico de LVC. Além disso, os cães com LV podem se tornar mais debilitados e mais susceptíveis a infecções oportunistas, o que pode facilitar a coinfeção por esses tripanossomatídeos. Mas este assunto é algo que ainda precisa de maiores investigações para melhor entendimento. Na literatura são descritos casos de infecções em humanos por tripanossomatídeos monoxênicos em infecções oportunistas - pacientes infectados por *Leishmania donovani* e o tripanossomatídeo monoxênico *Leptomonas seymouri*, na Índia (THAKUR *et al.*, 2020); pacientes imunossuprimidos com HIV e infectados com o parasito monoxênico *Leptomonas pulexsimulantis*, no Brasil (PACHECO *et al.*, 1998) e paciente com infecção grave e fatal e sinais clínicos compatíveis com leishmaniose visceral mas foi detectado apenas o tripanossomatídeo monoxênico do gênero *Crithidia* (MARUYAMA *et al.*, 2019).

Com o intuito de detectar uma possível infecção por esses tripanossomatídeos nos cães deste estudo e também de confirmar a espécie de *Leishmania* que estava infectando esses animais, foi utilizada a técnica de biologia molecular PCR-RFLP em amostras de fragmento de pele, e os alvos selecionados foram o hsp70 e o ITS1, indicados para o diagnóstico de infecção por *Leishmania* spp.. A infecção por *L. infantum* foi confirmada em todos os cães positivos na PCR-RFLP, diferente do que foi encontrado no capítulo 1 deste trabalho, no qual alguns cães soropositivos nos testes DPP e ELISA confirmaram infecção por outras espécies de *Leishmania*. Este resultado nos mostra que

embora possam ocorrer reações cruzadas com outras espécies de *Leishmania*, ainda assim, os testes sorológicos preconizados pelo MS são bons testes para o diagnóstico de LVC.

Além da detecção desses parasitos através das técnicas de biologia molecular diretamente das amostras coletadas, tanto amostras de pulgas quanto amostras de pele também foram submetidas ao meio de cultura NNN/LIT com o intuito de isolar *Leishmania* spp.. Conforme esperado, dos tripanossomatídeos isolados de pele de cães de Itabirito e Sabará, 95.3% (41/43) eram *L. infantum*, contudo, em duas amostras os tripanossomatídeos isolados foram da espécie *Leishmania guyanensis*. Esta espécie já foi detectada em amostras de sangue de cães do estado do Pará, região Norte do país (SANTOS *et al.*, 2020). Na região Sudeste, no estado de Minas Gerais, onde este estudo foi feito, é a primeira descrição de *L. guyanensis* isolada de pele de cães, mostrando a importância de maiores investigações acerca das espécies de *Leishmania* que estão em circulação nas regiões do país. Com as alterações em nosso ecossistema, os desequilíbrios em nossa biodiversidade têm gerado alterações na epidemiologia de diferentes doenças.

Os dois cães estavam coinfectados com *L. infantum* e *L. guyanensis*, *L. infantum* foi detectada na PCR-RFLP realizada diretamente da pele e a *L. guyanensis* foi detectada a partir do isolamento de fragmento de pele. Coinfecções entre diferentes espécies de *Leishmania* em cães já vêm sendo descritas ao longo dos anos (ALVES SOUZA *et al.*, 2019; MADEIRA *et al.*, 2006). Os dois cães coinfectados apresentavam sinais clínicos como secreção ocular, alopecia, descamação, hiperkeratose, lesões em ponta de orelha, onicogribose e linfadenomegalia.

Em relação às pulgas que foram submetidas ao isolamento no meio de cultura NNN/LIT, de todas as 94 amostras submetidas, houve crescimento em apenas uma, mostrando que isolar parasitos de ectoparasitos em meio de cultura ainda é um processo difícil de ser realizado, uma vez que há muita contaminação por bactérias e fungos, mesmo tomando os cuidados necessários e utilizando

antibióticos e antifúngicos. Na amostra em que foi obtido um resultado positivo de isolamento, foram observados ao microscópio grumos de tripanossomatídeos, formando rosetas. Eram parasitos com menor motilidade quando comparados com amostras de isolados de *Leishmania* spp., além disso, a quantidade de parasitos também era menor por campo observado. Talvez utilizando o meio de cultura Schneider, como é descrito em trabalhos com tripanossomatídeos monoxênicos (LUKES; VOTÝPKA, 2020) possa facilitar o desenvolvimento do tripanossomatídeos isolados.

Para essa amostra de isolado foi realizada a extração de DNA da massa de cultura para a identificação do parasito utilizando a técnica de sequenciamento e, após as análises, chegou-se ao gênero *Blechromonas*, assim como o gênero encontrado nas pulgas que foram submetidas diretamente às técnicas moleculares. Este gênero de tripanossomatídeo foi isolado também de pulgas na República Tcheca, sendo esta a primeira descrição de isolamento deste gênero aqui no Brasil. Este isolado descrito na literatura foi realizado em diversas espécies de pulgas, sendo que a espécie encontrada nas pulgas da espécie *C. felis* foi *Blechromonas campbelli* e *Blechromonas lauriereadi* e essas pulgas foram retiradas de raposas (*Vulpes vulpes*) e gatos selvagens (*Felis silvestris*) (VOTÝPKA *et al.*, 2013). O resultado obtido neste trabalho chama ainda mais a atenção pelo fato de serem pulgas que parasitam animais domésticos, principalmente, cães, que são animais que possuem um contato extremamente próximo com os humanos. Desta forma, é importante atentar-se para possíveis infecções tanto em cães quanto em humanos com esses tripanossomatídeos, uma vez que já é sabido da possibilidade de infecção de hospedeiros vertebrados por esses parasitos. Com relação ao cão como um possível hospedeiro deste parasito, mesmo que uma parasitose sem patogenia, uma hipótese é de que possa haver a geração de respostas imunes e, como consequência, diagnósticos falsos positivos para a LVC. Outra hipótese é a possível interferência desses parasitos no curso da LV no cão e também no

tratamento não responsivo. Assim, mais investigações são necessárias para que esses questionamentos possam ser respondidos.

6 Conclusões

Foi encontrada alta taxa de positividade nos testes DPP e ELISA (33.6%) para leishmaniose visceral canina (LVC) em cães de abrigos com elevado número de animais em áreas endêmicas para a doença.

Sugere-se que abrigos com elevado número de animais possa favorecer a presença de agentes infecciosos, transformando em potenciais focos de doenças zoonóticas.

Sete cães positivos nos testes DPP e ELISA para LVC foram positivos para *Leishmania amazonensis* na PCR-RFLP, mostrando que o ideal é que sejam utilizadas técnicas de biologia molecular para identificar as espécies envolvidas nas infecções.

Esta é a primeira descrição de detecção de *L. amazonensis* em pele de cão, este resultado sugere que cães possam atuar também como reservatórios dessa espécie, contudo, mais investigações são necessárias para esta afirmação.

Nos cães positivos para *L. amazonensis* não foram observadas alterações expressivas nos sinais clínicos, nos exames hematológicos e nos exames bioquímicos, sugerindo que a infecção por esta espécie parece ser menos patogênica do que por *Leishmania infantum*. Porém, como o número de animais foi pequeno, estudos com um maior número de cães devem ser feitos.

O cão que estava coinfectado com *L. infantum* e *L. amazonensis* não apresentou sinais clínicos mais intensos e nem alterações severas nos exames hematológico e bioquímicos, porém, mais estudos são necessários para avaliar a patogenicidade desta coinfeção.

Abrigos de animais necessitam de maior atenção por parte de agentes públicos da área de saúde pública, pois são ambientes que albergam elevados números de animais e por não haver uma fiscalização adequada podem tornar focos de doenças infecciosas para os animais e para os humanos.

Os cães dos abrigos apresentaram elevada taxa de coinfeção pelos protozoários *Leishmania* spp. e *Babesia* spp. (36.8%) nas técnicas de PCR, demonstrando que há uma elevada circulação de ambos os agentes nesses ambientes de aglomeração canina.

É importante que em áreas endêmicas para LVC e babesiose os médicos veterinários sempre pensem em coinfeções por hemoparasitos durante o diagnóstico, pois facilita a instituição dos tratamentos necessários e determina melhor o prognóstico do paciente.

Os cães das cidades de Itabirito e Sabará, soro reagentes para LVC, apresentaram elevadas taxas de infestação por pulgas da espécie *Ctenocephalides felis felis*, sendo as porcentagens das infestações de 81.9% e 67.7%, respectivamente para cada cidade.

Não foi detectado DNA de *L. infantum* nas pulgas coletadas dos cães positivos para LVC, mas foi detectado DNA de tripanossomatídeos monoxênicos em 12,7% das pulgas. Além disso, tripanossomatídeos monoxênicos foram isolados das pulgas *C. felis felis* em meio de cultura NNN/LIT. Após as análises de sequenciamento para o alvo v7v8 chegou-se ao gênero *Blechnomonas*, sendo esta a primeira descrição do gênero no Brasil.

Das amostras de pele dos cães soro reagentes para LVC da cidade de Sabará submetidas ao meio de cultura NNN/LIT duas apresentaram padrão de restrição da RFLP diferente de *L. infantum*, após o sequenciamento das amostras confirmou-se ser a espécie *L. guyanensis*. Esta é a primeira descrição de isolamento de *L. guyanensis* de pele de cães, chamando a atenção, mais uma vez, para a importância de análises moleculares para a identificação das espécies envolvidas nas infecções por *Leishmania* spp.

A elevada taxa de infestação por pulgas nos cães soro reagentes para *L. infantum* sugere que estudos são necessários para investigar a relação desses tripanossomatídeos detectados nas pulgas e a LVC.

Referências

- ADACHI, K; UENO, C; MAKIMURA, S. Immunosuppression in Dogs Naturally Infected with *Babesia gibsoni*. **J. Vet. Med. Sci.**, vol. 55, no. 3, p. 503–505, 1993. Available at: http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/%0Ahttps://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038080620318011%0Ahttps://www.jstage.jst.go.jp/article/jjshs1925/72/6/72_6_525/_article/-c.
- AKTAS, M; ÖZÜBEK, S; ALTAY, K; IPEK, N D S; BALKAYA, I; UTUK, A E; KLRBAS, A; ŞİMSEK, S; DUMANLL, N. Molecular detection of tick-borne rickettsial and protozoan pathogens in domestic dogs from Turkey. **Parasites and Vectors**, vol. 8, no. 1, p. 4–9, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0763-z>.
- ALLISON, R W.; LITTLE, S E. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. **Veterinary Clinical Pathology**, vol. 42, no. 2, p. 127–144, 2013. <https://doi.org/10.1111/vcp.12040>.
- ALVES SOUZA, N; SOUZA LEITE, R; DE OLIVEIRA SILVA, S; GROENNER PENNA, M; FIGUEIREDO FELICORI VILELA, L; MELO, M N; DE ANDRADE, A S R. Detection of mixed *Leishmania* infections in dogs from an endemic area in southeastern Brazil. **Acta Tropica**, vol. 193, p. 12–17, 2019. DOI 10.1016/j.actatropica.2019.02.016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.016>.
- AMUSATEGUI, I; TESOURO, M A.; KAKOMA, I; SAINZ, A. Serological reactivity to *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from Northwestern Spain. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, vol. 8, no. 6, p. 797–803, 2008. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0277>.
- ANTOGNONI, M T; VERONESI, F; MORGANTI, G; MANGILI, V; FRUGANTI, G; MIGLIO, A. Infezione naturale sostenuta da *Anaplasma platys* in cani residenti in regione Umbria, Italia Centrale. **Veterinaria Italiana**, vol. 50, no. 1, p. 49–56, 2014. <https://doi.org/10.12834/VetIt.82.258.2>.
- ARIAS, J. R.; DE FREITAS, R. A.; NAIFF, R. D.; BARRETT, T. V. Observations on the parasite *Leishmania mexicana amazonensis* and its natural infection of the sand fly *Lutzomyia olmeca nociva*. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, vol. 21, no.

1, p. 48–54, 1987. .

ARRAGA-ALVARADO, C M.; QUROLLO, B A.; PARRA, O C.; BERRUETA, M A.; HEGARTY, B C.; BREITSCHWERDT, E B. Case report: Molecular evidence of anaplasma platys infection in two women from venezuela. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 91, no. 6, p. 1161–1165, 2014. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0372>.

ATTIPA, C; SOLANO-GALLEGO, L; PAPASOULIOTIS, K; SOUTTER, F; MORRIS, D; HELPS, C; CARVER, S; TASKER, S. Association between canine leishmaniosis and Ehrlichia canis co-infection: A prospective case-control study. **Parasites and Vectors**, vol. 11, no. 1, p. 1–9, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2717-8>.

BAKER, D. C.; SIMPSON, M.; GAUNT, S. D.; CORSTVET, R. E. Acute Ehrlichia platys Infection in the Dog. **Veterinary Pathology**, vol. 24, no. 5, p. 449–453, 1987. <https://doi.org/10.1177/030098588702400513>.

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 in Parasitology**, vol. 24, no. 7, p. 324–330, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>.

BAXARIAS, M; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A; MARTÍNEZ-ORELLANA, P; MONTSERRAT-SANGRÀ, S; ORDEIX, L; ROJAS, A; NACHUM-BIALA, Y; BANETH, G; SOLANO-GALLEGO, L. Does co-infection with vector-borne pathogens play a role in clinical canine leishmaniosis? **Parasites and Vectors**, vol. 11, no. 135, p. 1–16, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2724-9>.

BEASLEY, E A; PESS, D; SCORZA, B M; PETERSEN, C A. Epidemiologic, Clinical and Immunological Consequences of Co-Infections during Canine Leishmaniosis. **Animals**, vol. 11, no. 3206, p. 1–28, 2021. .

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. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 61, no. 5, p. 1035–1043, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000500004>.

BORGHEAN, T C.; FERREIRA, R C.; TAKATA, C S.A.; CAMPANER, M; BORDA, C C.;

PAIVA, F; MILDER, R V.; TEIXEIRA, M M.G.; CAMARGO, E P. Molecular Phylogenetic Redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a Genus of Insect Parasites Associated with Flies. **Protist**, vol. 164, no. 1, p. 129–152, 2013. DOI 10.1016/j.protis.2012.06.001. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.protis.2012.06.001>.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z.; FERREIRA, F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 61, no. 3, p. 566–571, 2009. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352009000300007>.

BORJA, L S; SOUSA, O M F; SOLCÀ, M S; BASTOS, L A; BORDONI, M; MAGALHÃES, J T; LARANGEIRA, D F; BARROUIN-MELO, S M; FRAGA, D B M; VERAS, P S 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. **Veterinary Parasitology**, vol. 229, p. 110–117, 2016. DOI 10.1016/j.vetpar.2016.10.004. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.004>.

BREITSCHWERDT, E B.; HEGARTY, B C.; QUROLLO, B A.; SAITO, T B.; MAGGI, R G.; BLANTON, L S.; BOUYER, D H. Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. **Parasites and Vectors**, vol. 7, no. 1, p. 1–7, 2014. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-298>.

CARDOSO, L; TUNA, J; VIEIRA, L; YISASCHAR-MEKUZAS, Y; BANETH, G. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. **Veterinary Journal**, vol. 183, no. 2, p. 232–233, 2010. DOI 10.1016/j.tvjl.2008.10.009. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.10.009>.

CEDEF, 2021. Atenção aos acumuladores de animais, leishmaniose visceral canina e esporotricose zoonótica. **Ministério Público do Estado de Minas Gerais**. 2021. 134p.

CHAUVIN, A; MOREAU, E; BONNET, S; PLANTARD, O; MALANDRIN, L. Babesia and its hosts: Adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, vol. 40, no. 2, 2009. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009020>.

COHN, L A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, vol. 33, no. 4, p. 863–884, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00031-7).

CONVIT, J.; ULRICH, M.; FERNÁNDEZ, C. T.; TAPIA, F. J.; CÁCERES-DITTMAR, G.; CASTÉS, M.; RONDÓN, A. J. The clinical and immunological spectrum of american cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 87, no. 4, p. 444–448, 1993. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(93\)90030-T](https://doi.org/10.1016/0035-9203(93)90030-T).

COSTA-JR, L. M.; REMBECK, K.; PASSOS, L. M.F.; RIBEIRO, M. F.B. Factors associated with epidemiology of Anaplasma platys in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, vol. 109, no. 3–4, p. 321–326, 2013. DOI 10.1016/j.prevetmed.2012.10.011. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.10.011>.

COSTA-JR, L M; REMBECK, K; RIBEIRO, M F B; BEELITZ, P; PFISTER, K; PASSOS, L M F. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **Veterinary Journal**, vol. 174, no. 3, p. 673–676, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.11.002>.

COSTA, M.M.S.; LIMA, W.G.; FIGUEIREDO, M.M.; MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L.. Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with Leishmania infantum: A histopathologic and Immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. **Veterinary Pathology**, vol. 45, no. 5, p. 613–616, 2008. <https://doi.org/10.1097/00004045-200207000-00018>.

COURA-VITAL, W; MARQUES, M J; VELOSO, V M; ROATT, B M; DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R D; REIS, L E S; BRAGA, S L; MORAIS, M H F; REIS, A B; CARNEIRO, M. Prevalence and factors associated with Leishmania infantum infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 5, no. 8, p. 1–10, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001291>.

COUTINHO, M T Z; LINARDI, P M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, vol. 147, no. 3–4, p. 320–325, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.008>.

CRIADO-FORNELIO, A.; GÓNZALEZ-DEL-RÍO, M. A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Molecular characterization of a Babesia gibsoni isolate from a Spanish dog. **Veterinary Parasitology**, vol. 117, no. 1–2, p. 123–129, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.08.006>.

DA COSTA-VAL, A P; CAVALCANTI, R R; DE FIGUEIREDO GONTIJO, N; MARQUES MICHALICK, M S; ALEXANDER, Bruce; WILLIAMS, Paul; MELO, Maria Norma. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Veterinary Journal**, vol. 174, no. 3, p. 636–643, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.11.006>.

DA CUNHA, G R; MARTINS, C M; CECCON-VALENTE, M F; DA SILVA, L L; MARTINS, F D; FLOETER, D; ROBERTSON, J V; FERREIRA, F; BIONDO, A W. Frequência e distribuição espacial do acúmulo compulsivo de animais e objetos em Curitiba, Paraná, Brasil. **Cadernos de Saude Publica**, vol. 33, no. 2, p. 1–12, 2017. <https://doi.org/10.1590/0102-311x00001316>.

DAGNONE, A S; DE MORAIS, H S A; VIDOTTO, M C.; JOJIMA, F S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, vol. 117, no. 4, p. 285–290, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.001>.

DAHMANI, M; LOUDAHI, A; MEDIANNIKOV, O; FENOLLAR, F; RAOULT, D; DAVOUST, B. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Kabylie, Algeria. **Ticks and Tick-borne Diseases**, vol. 6, no. 2, p. 198–203, 2015. DOI 10.1016/j.ttbdis.2014.12.007. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.12.007>.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites and Vectors**, vol. 1, no. 1, p. 1–17, 2008a. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-25>.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, vol. 152, no. 3–4, p. 173–185, 2008b. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>.

DANTAS-TORRES, F; ALEXANDRE, J; MIRANDA, D E O; FIGUEREDO, L A; SALES, K G S; DE SOUSA-PAULA, L C; DA SILVA, L G; VALLE, G R; RIBEIRO, V M; OTRANTO, D; DEUSTER, K; POLLMEIER, M; ALTREUTHER, G. Molecular epidemiology and prevalence of babesial infections in dogs in two hyperendemic foci in Brazil. **Parasitology Research**, vol. 120, no. 7, p. 2681–2687, 2021. DOI 10.1007/s00436-021-07195-8. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07195-8>.

DANTAS-TORRES, F; FIGUEREDO, L A. Canine babesiosis: A Brazilian perspective.

Veterinary Parasitology, vol. 141, no. 3–4, p. 197–203, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.030>.

DARIO, M A; LISBOA, C V; SILVA, M V; HERRERA, H M; ROCHA, F L; FURTADO, M C; MORATELLI, R; ROQUE, A L R; JANSEN, A M. Crithidia mellificae infection in different mammalian species in Brazil. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, vol. 15, no. March, p. 58–69, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.04.003>.

DEANE, L M; DEANE, M V P; ALENCAR, J E. Observações sobre o combate ao Phlebotomus longipalpis pela dedetização domiciliar, em área endêmica de calazar no Ceará. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v.7, n.1, p.131-141. 1955.

DE AVELAR, D M; MELO, M N; LINARDI, P M. Morphology and growth characteristics of cultured Leptomonas ctenocephali from Ctenocephalides felis felis (Siphonaptera: Pulicidae) of dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, vol. 180, no. 3–4, p. 394–398, 2011. DOI 10.1016/j.vetpar.2011.03.028. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.028>.

DE CASTRO, M B; MACHADO, R Z; DE AQUINO, L P C T; ALESSI, A C; COSTA, M T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: Clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, vol. 119, no. 1, p. 73–86, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.012>.

DE SCALLY, M. P.; LEISEWITZ, Andrew L.; LOBETTI, R. G.; THOMPSON, P. N. The elevated serum urea: Creatinine ratio in canine babesiosis in South Africa is not of renal origin. **Journal of the South African Veterinary Association**, vol. 77, no. 4, p. 175–178, 2006. <https://doi.org/10.4102/jsava.v77i4.373>.

DE SOUSA, K C M; ANDRÉ, M R; HERRERA, H M; ANDRADE, G B; JUSI, M M G; SANTOS, L L; BARRETO, W T G; MACHADO, R Z; OLIVEIRA, G P. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for Leishmania infantum in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, vol. 22, no. 4, p. 525–531, 2013. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612013000400012>.

DE TOMMASI, A S; OTRANTO, D; DANTAS-TORRES, F; CAPELLI, G; BREITSCHWERDT, E B.; DE CAPRARIIS, D. Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? **Parasites and Vectors**, vol. 6, no. 1, 2013. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-97>.

DIAS, E S; REGINA-SILVA, S; FRANÇA-SILVA, J C; PAZ, G F; MICHALSKY, É M; ARAÚJO, S C; VALADÃO, J L; DE OLIVEIRA LARA-SILVA, F; DE OLIVEIRA, F S; PACHECO, R S; FORTES-DIAS, C L. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, vol. 176, no. 2–3, p. 101–111, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.014>.

DINIZ, P P V P.; BEALL, M J.; OMARK, K; CHANDRASHEKAR, R; DANILUK, D A.; CYR, K E.; KOTERSKI, J F.; ROBBINS, R G.; LALO, P G.; HEGARTY, B C.; BREITSCHWERDT, E B. High prevalence of tick-borne pathogens in dogs from an Indian reservation in Northeastern Arizona. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, vol. 10, no. 2, p. 117–123, 2010. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0184>.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: Unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combi. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 51, no. 6, p. 2145–2165, 2001. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>.

EIRAS, D F; CRAVIOTTO, M B; VEZZANI, D; EYAL, O; BANETH, G. First description of natural Ehrlichia canis and Anaplasma platys infections in dogs from Argentina. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, vol. 36, no. 2, p. 169–173, 2013. DOI 10.1016/j.cimid.2012.11.008. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.11.008>.

EL TAIL, N O; OSMAN, F O; EL FARI, M; PRESBER, W; SCHÖNIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of Leishmania cfonovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 94, p. 575–579, 2000. .

FERREIRA, E C; CRUZ, I; CAÑAVATE, C; DE MELO, L A; PEREIRA, A A S; MADEIRA, F A.M.; VALÉRIO, S A N; CUNHA, H M; PAGLIA, A P; GONTIJO, C M F. Mixed infection of Leishmania infantum and Leishmania braziliensis in rodents from endemic urban area of the New World. **BMC Veterinary Research**, vol. 11, no. 1, p. 1–7, 2015.

<https://doi.org/10.1186/s12917-015-0392-y>.

FERREIRA, M G P A; FATTORI, K R; SOUZA, F; LIMA, V M F. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, vol. 165, no. 1–2, p. 150–154, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.026>.

FERREIRA, R F; CERQUEIRA, A M F; PEREIRA, A M; VELHO, P B; AZEVEDO, R R M; RODRIGUES, I L F; ALMOSNY, N R P. AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE REAÇÃO CRUZADA EM CÃES PCR-POSITIVOS PARA *Anaplasma platys* TESTADOS EM ELISA COMERCIAL PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS DE *Anaplasma phagocytophilum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, vol. 17, no. 1, p. 5–8, 2008. .

FRANÇA-SILVA, J C.; BARATA, R A.; DA COSTA, R T.; MONTEIRO, É M; MACHADO-COELHO, G L.L.; VIEIRA, E P.; PRATA, A; MAYRINK, W; NASCIMENTO, E; FORTES-DIAS, C L.; DA SILVA, J C.; DIAS, E S. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, vol. 131, no. 3–4, p. 213–220, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.006>.

GALVIS-OVALLOS, F; UETA, A E; MARQUES, G O; SARMENTO, A M C; ARAUJO, G; SANDOVAL, C; TOMOKANE, T Y; DA MATTA, V L R; LAURENTI, M D; GALATI, E A B. Detection of *pintomyia fischeri* (Diptera: Psychodidae) with *leishmania infantum* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) promastigotes in a focus of visceral leishmaniasis in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, vol. 58, no. 2, p. 830–836, 2021.

<https://doi.org/10.1093/jme/tjaa199>.

GARCIA, L; KINDT, A; BERMUDEZ, H; LLANOS-CUENTAS, A; DE DONCKER, S; AREVALO, J; TINTAYA, K W Q; DUJARDIN, J C. Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 42, no. 5, p. 2294–2297, 2004.

<https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2294-2297.2004>.

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 randomised trial. **The Lancet**, vol. 360, p. 374–379, 2002. .

GIUNCHETTI, R C; MAYRINK, W; GENARO, O; CARNEIRO, C M; CORRÊA-OLIVEIRA, R;

MARTINS-FILHO, O A; MARQUES, M J; TAFURI, W L; REIS, A B. Relationship between Canine Visceral Leishmaniosis and the Leishmania (Leishmania) chagasi Burden in Dermal Inflammatory Foci. **Journal of Comparative Pathology**, vol. 135, p. 100–107, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.06.005>.

GIUNCHETTI, R C; MARTINS-FILHO; ASSIS, O; CARNEIRO; MARTINS, C; 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.

Veterinary Immunology and Immunopathology, vol. 121, no. 1–2, p. 23–33, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.07.009>.

GUIMARÃES, V C F V; PRUZINOVA, K; SADLOVA, J; VOLFOVA, V; MYSKOVA, J; FILHO, S P B; VOLF, P. Lutzomyia migonei is a permissive vector competent for Leishmania infantum. **Parasites and Vectors**, vol. 9, no. 1, p. 1–6, 2016. DOI 10.1186/s13071-016-1444-2.

Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1444-2>.

HARRUS, S; KENNY, M; MIARA, L; AIZENBERG, I; WANER, T; SHAW, S. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental Ehrlichia canis infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 48,

no. 11, p. 4488–4490, 2004. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4488-4490.2004>.

HARRUS, S; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): An overview. **Veterinary Journal**, vol. 187, no. 3, p. 292–296, 2011. DOI

10.1016/j.tvjl.2010.02.001. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>.

HARRUS, S; WANER, T; AIZENBERG, I; FOLEY, J E.; POLAND, A M.; BARK, H.

Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with Ehrlichia canis.

Journal of Clinical Microbiology, vol. 36, no. 1, p. 73–76, 1998.

<https://doi.org/10.1128/jcm.36.1.73-76.1998>.

HARVEY, J W.; SIMPSON, C F.; GASKIN, J M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, vol. 137, no. 2, p. 182–188, 1978. <https://doi.org/10.1093/infdis/137.2.182>.

HEGARTY, B C.; QUROLLO, B A.; THOMAS, B; PARK, K; CHANDRASHEKAR, R; BEALL, M J.; THATCHER, B; BREITSCHWERDT, E B. Serological and molecular analysis of feline vector-borne anaplasmosis and ehrlichiosis using species-specific peptides and PCR.

Parasites and Vectors, vol. 8, no. 1, p. 1–9, 2015. DOI 10.1186/s13071-015-0929-8.

Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0929-8>.

ISHEMGULOVA, A; BUTENKO, A; KORTIŠOVÁ, L; BOUCINHA, C; GRYBCHUK-IEREMENKO, A; MORELLI, K A.; TESAŘOVÁ, M; KRAEVA, N; GRYBCHUK, D; PÁNEK, T; FLEGONTOV, P; LUKEŠ, J; VOTÝPKA, J; PAVAN, M G; OPPERDOES, F R.; SPODAREVA,.; D'AVILA-LEVY, C M.; KOSTYGOV, A Y; YURCHENKO, V. Molecular mechanisms of thermal resistance of the insect trypanosomatid *Crithidia thermophila*. **PLoS ONE**, vol. 12, no. 3, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174165>.

KIDD, L.; QUROLLO, B.; LAPPIN, M.; RICHTER, K.; HART, J. R.; HILL, S.; OSMOND, C.; BREITSCHWERDT, E. B. Prevalence of Vector-Borne Pathogens in Southern California Dogs With Clinical and Laboratory Abnormalities Consistent With Immune-Mediated Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, vol. 31, no. 4, p. 1081–1090, 2017. <https://doi.org/10.1111/jvim.14735>.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; PINELLI, E.; DEL REAL, G.; MOLINA, R.; VITUTIA, M.M.; CAÑAVATE, M.C.; NIETO, J. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies . **Parasite**, vol. 1, no. 4, p. 311–318, 1994. <https://doi.org/10.1051/parasite/1994014311>.

LABRUNA, M B; PEREIRA, M C. **Carrapato em cães no Brasil**. *Clínica Veterinária*, v. 6, n. 30, p. 24-32, 2001

LASTA, C S; SANTOS, A P; MESSICK, J B; OLIVEIRA, S T; BIONDO, A W; VIEIRA, R F C; DALMOLIN, M L; GONZÁLEZ, F H D. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, vol. 22, no. 3, p. 360–366, 2013. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612013000300007>.

LATROFA, M S; DANTAS-TORRES, F; DE CAPRARIIS, D; CANTACESSI, C; CAPELLI, G; LIA, R P; BREITSCHWERDT, E B.; OTRANTO, D. Vertical transmission of *Anaplasma platys* and *Leishmania infantum* in dogs during the first half of gestation. **Parasites and Vectors**, vol. 9, no. 1, p. 1–6, 2016. DOI 10.1186/s13071-016-1545-y. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1545-y>.

LIMA, I D.; QUEIROZ, J W.; LACERDA, H G.; QUEIROZ, P V.S.; PONTES, N N.;

BARBOSA, J D.A.; MARTINS, D R.; WEIRATHER, J L.; PEARSON, R D.; WILSON, M E.; JERONIMO, S M.B. Leishmania infantum chagasi in Northeastern Brazil: Asymptomatic infection at the urban perimeter. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 86, no. 1, p. 99–107, 2012. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.10-0492>.

LINARDI, P M. Checklist de Simuliidae (Insecta, Diptera) do Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, vol. 11, no. suppl 1, p. 667–674, 2011. <https://doi.org/10.1590/s1676-06032011000500031>.

LINARDI, P.M. & GUIMARÃES, L.R. Sifonápteros do Brasil. São Paulo: Museu de Zoologia, USP/FAPESP. 2000. 291p

LINARDI, P.M. & NAGEM, R.L. 1972. Observações sobre o ciclo evolutivo de *Ctenocephalides felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera, Pulicidae) e sua sobrevivência fora do hospedeiro. **Bol. Mus. Hist. Nat. UFMG Zool.** 13:1-22.

LOBETTI, R. G.; MÖHR, A. J.; DIPPENAAR, T.; MYBURGH, E. A preliminary study on the serum protein response in canine babesiosis. **Journal of the South African Veterinary Association**, vol. 71, no. 1, p. 38–42, 2000. .

LOBETTI, R; DVIR, E; PEARSON, J. Cardiac troponins in canine babesiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, vol. 16, no. 1, p. 63–68, 2002. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2002.tb01607.x>.

LOPES, J V.; MICHALSKY, É M.; LARA SILVA, F O.; LIMA, A C V.M.R.; DE AVELAR, D M.; DA COSTA, A A.J; FRANÇA-SILVA, J C.; REGINA-SILVA, S; FORTES-DIAS, C L.; DIAS, E S. Seroprevalence and molecular characterization of Leishmania in dogs from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, vol. 5, no. 1, p. 70–74, 2017. DOI 10.1016/j.ijvsm.2017.02.002. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.02.002>.

LOULY, C C B; FONSECA, I N; OLIVEIRA, V F; BORGES, L M F. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no município de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, vol. 7, no. 1, p. 103–106, 2006. .

LUKES, J; VOTÝPKA, J. **Field Isolation and Cultivation of Trypanosomatids from Insects**. [S. l.: s. n.], 2020. vol. 2116, . https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0294-2_42.

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. M.P.; PACHECO, R. S.; OLIVEIRA, F. S.; PEREIRA, S. A.; FIGUEIREDO, F. B.; BAPTISTA, C.; MARZOCHI, M. C.A. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 100, no. 5, p. 442–445, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.07.011>.

MAGGI, R G.; KRÄMER, F. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. **Parasites and Vectors**, vol. 12, no. 1, p. 1–37, 2019. DOI 10.1186/s13071-019-3407-x. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3407-x>.

MAGGI, R G; MASCARELLI, P E; HAVENGA, L N; NAIDOO, V; BREITSCHWERDT, Edward B. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian 2015 ACMT Annual Scientific Meeting, March 27–29, 2015 Clearwater Beach, FL. **Parasit Vectors**, vol. 6, no. 1, p. 103, 2013. Available at: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1756-3305-6-103>.

MAIA, C; RAMADA, J; CRISTÓVÃO, J M.; GONÇALVES, L; CAMPINO, L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. **Veterinary Journal**, vol. 179, no. 1, p. 142–144, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.009>.

MALAQUIAS, L C C; DO CARMO ROMUALDO, R; DO ANJOS, J B; GIUNCHETTI, R C; CORRÊA-OLIVEIRA, R; REIS, A B. Serological screening confirms the re-emergence of canine leishmaniosis in urban and rural areas in Governador Valadares, Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil. **Parasitology Research**, vol. 100, no. 2, p. 233–239, 2007.
<https://doi.org/10.1007/s00436-006-0259-z>.

MANNA, L; VITALE, F; REALE, S; CARACAPPA, S; PAVONE, L M; MORTE, R D; CRINGOLI, G; STAIANO, N; GRAVINO, A E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, vol. 125, no. 3–4, p. 251–262, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.019>.

MARCELINO, A P; SOUZA FILHO, JOB ALVES BASTOS, C V; RIBEIRO, S R; MEDEIROS, F A C; REIS, I A; LIMA, A C. R. V M; BARBOSA, J R; PAZ, G F; GONTIJO, C M F.

Comparative PCR-based diagnosis for the detection of *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Acta Tropica**, vol. 207, p. 1–6, 2020. DOI 10.1016/j.actatropica.2020.105495. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105495>.

MARUYAMA, S R; SANTANA, A K M; TAKAMIYA, N T; TAKAHASHI, T Y; ROGERIO, L A; OLIVEIRA, C A B; MILANEZI, C M; TROMBELA, V A; CRUZ, A K; JESUS, A R; BARRETO, A S; SILVA, A M; ALMEIDA, R P; RIBEIRO, J M; SILVA, J S. Non-*Leishmania* Parasite in Fatal Visceral Leishmaniasis-Like Disease, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, vol. 25, no. 11, p. 3–7, 2019. .

MEKUZAS, Y.; GRADONI, L.; OLIVA, G.; FOGLIA MANZILLO, V.; BANETH, G. *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* co-infection: A 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 15, no. SUPPL. 2, p. 30–31, 2009. DOI 10.1111/j.1469-0691.2008.02150.x. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02150.x>.

MICHALSKY, E M; ROCHA, M F; DA ROCHA LIMA, A C V M; FRANÇA-SILVA, J C; PIRES, M Q; OLIVEIRA, F S; PACHECO, R S; DOS SANTOS, S L; BARATA, R A; ROMANHA, Á J; FORTES-DIAS, C L; DIAS, E S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**, vol. 147, no. 1–2, p. 67–76, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.004>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Visceral**. 2021. Available at: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Tegumentar**. 2021. Available at: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt>

MIRÓ, G; MONTOYA, A; ROURA, X; GÁLVEZ, R; SAINZ, A. Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: A multicentre study. **Parasites and Vectors**, vol. 6, no. 1, p. 1–9, 2013. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-117>.

MONTOYA-LERMA, J.; CADENA, H.; OVIEDO, M.; READY, P. D.; BARAZARTE, R.; TRAVI, B. L.; LANE, R. P. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. **Acta Tropica**, vol. 85, no. 1, p. 19–29, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(02\)00189-4](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(02)00189-4).

MYLONAKIS, M E.; HARRUS, S; BREITSCHWERDT, E B. An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). **Veterinary Journal**, vol. 246, p. 45–53, 2019. DOI 10.1016/j.tvjl.2019.01.015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.015>.

NOGUEIRA, F S; AVINO, V C; GALVIS-OVALLOS, F; PEREIRA-CHIOCCOLA, V L; MOREIRA, M A B; ROMARIZ, A P P L; MOLLA, L M.; MENZ, I. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites and Vectors**, vol. 12, no. 79, p. 1–11, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3323-0>.

NUNES, C M; PIRES, M M; DA SILVA, K M; ASSIS, F D; FILHO, J G; PERRI, S H V. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, vol. 170, no. 1–2, p. 131–133, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.044>.

O'DWYER, L H O; MASSARD, C L. Babesiose em pequenos animais domésticos e como zoonoses. p.67-67. In: Almosny N R P. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. Editora L.F. Livros de Veterinária, Rio de Janeiro, 2002. 135p.

OTRANTO, D; DANTAS-TORRES, F; BREITSCHWERDT, E B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. **Trends in Parasitology**, vol. 25, no. 5, p. 228–235, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.02.005>.

PACHECO, R S.; MARZOCHI, M C.A.; PIRES, M Q.; BRITO, C M.M.; MADEIRA, M F; BARBOSA-SANTOS, E G.O. Parasite Genotypically Related to a Monoxenous Trypanosomatid of Dog's Flea Causing Opportunistic Infection in an HIV Positive Patient. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 93, no. 4, p. 531–537, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000400021>.

PALAVESAM, A; JYOTHIMOL, G.; GR, B; ARAVIND, M.; R, R N; LATHA, B Ravi; RAMAN, M. Evaluation of multiplex PCR assay for detection of *Babesia* spp, *Ehrlichia canis* and *Trypanosoma evansi* in dogs. **Acta Tropica**, vol. 188, p. 58–67, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.028>.

PALTRINIERI, S; SOLANO-GALEGO, L; FONDATI, A; LUBAS, G; GRADONI, 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. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, vol. 236, no. 11, p. 1200–1206, 2010.

<https://doi.org/10.2460/javma.236.11.1200>.

PATRONEK, G J. Hoarding of animals: An under-recognized public health problem in a difficult-to-study population. **Public Health Reports**, vol. 114, no. 1, p. 81–87, 1999.

<https://doi.org/10.1093/phr/114.1.81>.

PATRONEK, G J; LOAR, L; NATHANSON, J N. **Animal hoarding : structuring interdisciplinary responses to help people, animals and communities at risk.**

Editora:Hoarding of Animals Research Consortium. 2006. 50p.

PAZ, G F.; AVELAR, D M.; REIS, I A.; LINARDI, P M. Dynamics of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) Infestations on Urban Dogs in Southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, vol. 52, no. 5, p. 1159–1164, 2015. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv071>.

PAZ, G F.; REIS, I A.; AVELAR, D M.; FERREIRA, E C. M; WERNECK, G L. Ectoparasites and anti-*Leishmania* antibodies: Association in an observational case-control study of dogs from a Brazilian endemic area. **Preventive Veterinary Medicine**, vol. 112, no. 1–2, p. 156–159, 2013. DOI 10.1016/j.prevetmed.2013.07.012. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.07.012>.

PAZ, G F.; RIBEIRO, M F.B.; DE MAGALHÃES, D F.; SATHLER, K P.B.; MORAIS, M H F.; FIÚZA, V O.P.; BRANDÃO, S T.; WERNECK, G L.; FORTES-DIAS, C L; DIAS, E S.

Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. **Preventive Veterinary Medicine**, vol. 97, no. 2, p. 131–133, 2010a. DOI 10.1016/j.prevetmed.2010.08.006. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.08.006>.

PAZ, G F; RUGANI, J M N; MARCELINO, A P; GONTIJO, C M F. Implications of the use of serological and molecular methods to detect infection by *Leishmania* spp. in urban pet dogs. **Acta Tropica**, vol. 182, p. 198–201, 2018. DOI 10.1016/j.actatropica.2018.03.018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.03.018>.

PAZ, G F; RIBEIRO, M F B; MICHALSKY, É M; DA ROCHA LIMA, A C V M; FRANÇA-SILVA, J C; BARATA, R A; FORTES-DIAS, C L; DIAS, E S. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, vol. 106, no. 2, p. 523–528, 2010.

<https://doi.org/10.1007/s00436-009-1697-1>.

PEREIRA, A; PARREIRA, R; NUNES, M; CASADINHO, A; VIEIRA, M L; CAMPINO, L; MAIA, C. Molecular detection of tick-borne bacteria and protozoa in cervids and wild boars from Portugal. **Parasites and Vectors**, vol. 9, no. 1, 2016. DOI 10.1186/s13071-016-1535-0. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1535-0>.

PEREZ, M; BODOR, M; ZHANG, C; XIONG, Q; RIKIHISA, Y. Human infection with Ehrlichia canis accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol. 1078, p. 110–117, 2006. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.016>.

PEREZ, M; RIKIHISA, Y; WEN, B. Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: Antigenic and genetic characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 34, no. 9, p. 2133–2139, 1996. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.9.2133-2139.1996>.

POLAK, K. C.; LEVY, J. K.; CRAWFORD, P. C.; LEUTENEGGER, C. M.; MORIELLO, K. A. Infectious diseases in large-scale cat hoarding investigations. **Veterinary Journal**, vol. 201, no. 2, p. 189–195, 2014. DOI 10.1016/j.tvjl.2014.05.020. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.020>.

QUINNELL, R J; COURTENAY, O. Transmission , reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, vol. 136, p. 1915–1934, 2009. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991156>.

QUROLLO, B A.; BALAKRISHNAN, N; CANNON, C Ze; MAGGI, R G.; BREITSCHWERDT, E B. Co-infection with Anaplasma platys, Bartonella henselae, Bartonella koehlerae and “Candidatus Mycoplasma haemominutum” in a cat diagnosed with splenic plasmacytosis and multiple myeloma. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, vol. 16, no. 8, p. 713–720, 2014. <https://doi.org/10.1177/1098612X13519632>.

RAMOS, C A.N.; RAMOS, R A.N.; ARAÚJO, F R.; GUEDES, D S.; SOUZA, I I.F.; ONO, T M.; VIEIRA, A S.; PIMENTEL, D S.; ROSAS, E O.; FAUSTINO, M A.G.; ALVES, L C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de Ehrlichia canis e Anaplasma platys em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, vol. 18, no. 1, p. 58–62, 2009. <https://doi.org/10.4322/rbpv.018e1011>.

RAMOS, R A N; LATROFA, M S; GIANNELLI, A; LACASELLA, V; CAMPBELL, B E; DANTAS-TORRES, F; OTRANTO, D. Detection of Anaplasma platys in dogs and

Rhipicephalus sanguineus group ticks by a quantitative real-time PCR. **Veterinary Parasitology**, vol. 205, no. 1–2, p. 285–288, 2014. DOI 10.1016/j.vetpar.2014.06.023. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.023>.

RANDOLPH, S E. Do rising temperatures matter? **Ecology**, vol. 90, no. 4, p. 927–931, 2009. <https://doi.org/10.1890/08-0730.1>.

RÊGO, F D; SOUZA, G D; MIRANDA, J B; PEIXOTO, L V; ANDRADE-FILHO, J D. Potential vectors of leishmania parasites in a recent focus of visceral leishmaniasis in neighborhoods of Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, vol. 57, no. 4, p. 1286–1292, 2020. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa036>.

RÊGO, M A V. Aspectos históricos dos estudos caso-contro l e Historical issues in case-control studies. **Cad. Saúde Pública**, vol. 17, no. 4, p. 1017–1024, 2001.

RIBEIRO, V. M.; MIRANDA, J. B.; MARCELINO, A. P.; ANDRADE, H. M.; REIS, CARDOSO, M. S.; GONTIJO, C. M. F.; PAZ, G. F. Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs. **Veterinary Parasitology**. vol. 274, p. 1-6, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.014>.

ROCHA, M F; MICHALSKY, É M; LARA-SILVA, F O; VALADÃO, J L; FRANÇA-SILVA, J C; PINHEIRO, L C; DE SOUSA, J F; DOS SANTOS, R C; SOARES, M D; FORTES-DIAS, C L; DIAS, E S. Dogs with divergent serology for visceral Leishmaniasis as sources of leishmania infection for *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies – an observational study in an endemic area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 14, no. 2, p. 1–14, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008079>.

ROGERS, D. J.; RANDOLPH, S. E. Climate Change and Vector-Borne Diseases. **Advances in Parasitology**, vol. 62, no. 05, p. 345–381, 2006. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)62010-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)62010-6).

ROJAS, A; ROJAS, D; MONTENEGRO, V; GUTIÉRREZ, R; YASUR-LANDAU, D; BANETH, G. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: First molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. **Veterinary Parasitology**, vol. 199, no. 3–4, p. 121–128, 2014. DOI 10.1016/j.vetpar.2013.10.027. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.027>.

- ROMERO, G A.S.; BOELAERT, Marleen. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 4, no. 1, p. e584, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584>.
- ROMERO, L. E.; MENESES, A. I.; SALAZAR, L.; JIMÉNEZ, M.; ROMERO, J. J.; AGUIAR, D. M.; LABRUNA, M. B.; DOLZ, G. First isolation and molecular characterization of Ehrlichia canis in Costa Rica, Central America. **Research in Veterinary Science**, vol. 91, no. 1, p. 95–97, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.07.021>.
- ROTHSCHILD, M., SCHLEIN, Y., PARKER, K., NEVILLE, C. & STERNBERG, S. 1973. The flying leap of the flea. **Sci. Amer.** 229:92-100. <http://dx.doi.org/10.1038/scientificamerican1173-92>
- SAINZ, A.; AMUSATEGUI, I.; TESOURO, M. A. Ehrlichia platys infection and disease in dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, vol. 11, no. 4, p. 382–384, 1999. <https://doi.org/10.1177/104063879901100419>.
- SANTARÉM, V A; LAPOSY, C B; FARIAS, M R. INCLUSÕES PLAQUETÁRIAS SEMELHANTES A Anaplasma platys (Ehrlichia platys) EM GATO. **Colloquium Agrariae**, vol. 1, no. 2, p. 60–66, 2005. <https://doi.org/10.5747/ca.2005.v01.n2.a015>.
- SANTOS, F J.A.; NASCIMENTO, L C.S.; SILVA, W B.; OLIVEIRA, L P.; SANTOS, W S.; AGUIAR, D C.F.; GARCEZ, L M. First report of canine infection by leishmania (Viannia) guyanensis in the brazilian amazon. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, vol. 17, no. 22, p. 1–9, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijerph17228488>.
- SCORZA, B M.; CARVALHO, E M.; WILSON, M E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 18, no. 6, 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18061296>.
- SHROPSHIRE, S; OLVER, C; LAPPIN, M. Characteristics of hemostasis during experimental Ehrlichia canis infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, vol. 32, no. 4, p. 1334–1342, 2018. <https://doi.org/10.1111/jvim.15130>.
- SILVA, A M; CAMARGO, N J; SANTOS, D R; MASSAFERA, R; FERREIRA, A C; POSTAI, C; CRISTÓVÃO, E C; KONOLSAISEN, J F; BISELTO JR, A; PERINAZO, R; TEODORO, U; GALATI, E A B. Diversidade , Distribuição e Abundância de Flebotomíneos (Diptera : Psychodidae) no Paraná. **Neotropical Entomology**, vol. 37, no. 2, p. 209–225, 2008. .

- SOARES, A O.; SOUZA, A D.; FELICIANO, E A.; RODRIGUES, A F.S.F.; D'AGOSTO, M; DAEMON, E. Evaluation of ectoparasites and hemoparasites in dogs kept in apartments and houses with yards in the city of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, vol. 15, no. 1, p. 13–16, 2006. .
- SOARES, R; RAMOS, C A; PEDROSO, T; BABO-TERRA, V; CLEVELAND, H; DE ARAÚJO, F. Molecular survey of anaplasma platys and ehrlichia canis in dogs from Campo grande, Mato grosso do sul, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, vol. 89, no. 1, p. 301–306, 2017. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720150556>.
- SOCOL, V T; KUHN, A; PASQUALI, S; POZZOLO, E M; LEANDRO, S; CHIYO, L; BAGGIO, R A; MICHALISZYN, M S; CUBAS, H; PETERLLE, R; LOPES, O; PAZ, S; SILVA, C; BELMONTE, I L; BISETTO-JUNIOR, A. More than the eyes can see: The worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. **PlosOne**, vol. 12, no. 12, p. e0189182, 2017.
- SOLANO-GALLEGO, L; HEGARTY, B; ESPADA, Y; LLULL, J; BREITSCHWERDT, E. Serological and molecular evidence of exposure to arthropod-borne organisms in cats from northeastern Spain. **Veterinary Microbiology**, vol. 118, no. 3–4, p. 274–277, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.07.010>.
- 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 leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, vol. 4, no. 86, p. 1–16, 2011. .
- SOUZA, C S F, SILVA, V L; LABARTHE, N. Evaluation of DPP ® and SNAP ® Rapid Tests for diagnosis of Leishmania infantum canine infections. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, vol. 52, p. 1–4, 2019. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0154-2019>.
- THAKUR, L; KUSHWAHA, H R; NEGI, A; JAIN, A; JAIN, M. Leptomonas seymouri Co-infection in Cutaneous Leishmaniasis Cases Caused by Leishmania donovani From Himachal Pradesh, India. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol. 10, no. July, p. 1–8, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00345>.
- TOLEZANO, J E.; ULIANA, S R.B.; TANIGUCHI, H H.; ARAÚJO, M F.L.; BARBOSA, J A.R.; BARBOSA, J E.R.; FLOETER-WINTER, L M; SHAW, J J. The first records of Leishmania (Leishmania) amazonensis in dogs (Canis familiaris) diagnosed clinically as having canine

visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, vol. 149, no. 3–4, p. 280–284, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.008>.

TRAPP, S M.; DAGNONE, A S.; VIDOTTO, O; FREIRE, R L.; AMUDE, A M.; DE MORAIS, H S.A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population.

Veterinary Parasitology, vol. 140, no. 3–4, p. 223–230, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.030>.

VALDIVIA, H O.; ALMEIDA, L V.; ROATT, B M.; REIS-CUNHA, J L; PEREIRA, A A S; GONTIJO, C; FUJIWARA, R T; REIS, A B.; SANDERS, M J.; COTTON, J A.; BARTHOLOMEU, D C. Comparative genomics of canine-isolated Leishmania (Leishmania) amazonensis from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Scientific Reports**, vol. 7, p. 1–11, 2017. DOI 10.1038/srep40804.

Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep40804>.

VALE, A. M.; FUJIWARA, R. T.; DA SILVA NETO, A. F.; MIRET, J. A.; ALVAREZ, D. C.C.; DA SILVA, J. C.F.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Identification of highly specific and cross-reactive antigens of leishmania species by antibodies from leishmania (Leishmania) chagasi naturally infected dogs. **Zoonoses and Public Health**, vol. 56, no. 1, p. 41–48, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01183.x>.

<https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01183.x>.

VASCONCELOS, M F. Estudo Da Infecção Por Babesia Spp. Em Cães Da Região Periurbana De Brasília, Distrito Federal. **Dissertação**, , p. 85, 2010. .

VOTÝPKA, J; SUKOVÁ, E; KRAEVA, N; ISHEMGULOVA, A; DUŽÍ, I; LUKEŠ, J; YURCHENKO, V. Diversity of Trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) Parasitizing Fleas (Insecta: Siphonaptera) and Description of a New Genus Blechomonas gen. n. **Protist**, vol. 164, no. 6, p. 763–781, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.08.002>.

WARD, R. D.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; FRAIHA, H. Leishmaniasis in Brazil: VIII. Observations on the phlebotomine fauna of an area highly endemic for cutaneous leishmaniasis, in the Serra dos Carajás, Pará state. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 67, no. 2, p. 174–183, 1973.

<https://doi.org/10.1093/nq/s7-v.116.219c>.

WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, vol. 21, no. 1, p. 75–98, 1991. DOI 10.1016/S0195-5616(91)50009-7. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(91\)50009-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(91)50009-7).

XAVIER, S. C.; CHIARELLI, I. M.; LIMA, W. G.; GONÇALVES, R.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: A remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, vol. 58, no. 6, p. 994–1000, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000600004>.

YISASCHAR-MEKUZAS, Y; JAFFE, C L.; PASTOR, J; CARDOSO, L; BANETH, G. Identification of Babesia species infecting dogs using reverse line blot hybridization for six canine piroplasms, and evaluation of co-infection by other vector-borne pathogens. **Veterinary Parasitology**, vol. 191, no. 3–4, p. 367–373, 2013. DOI 10.1016/j.vetpar.2012.09.002. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.002>.

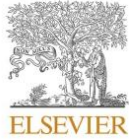
YURCHENKO, V Y.; LUKEŠ, J; JIRKŮ, M; MASLOV, D A. Selective recovery of the cultivation-prone components from mixed trypanosomatid infections: A case of several novel species isolated from Neotropical Heteroptera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 59, no. 4, p. 893–909, 2009. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.001149-0>.

ZYGNER W, RAPACKA G, GÓJSKA-ZYGNER O, DŁUGOSZ E, WEDRYCHOWICZ H. Biochemical abnormalities observed in serum of dogs infected with large Babesia in Warsaw (Poland). **Pol J Vet Sci**. 2007;10(4):245-53. PMID: 18198540.

Apêndice

Apêndice I – Artigo publicado referente ao estudo 1 deste trabalho.

Acta Tropica 232 (2022) 106492



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



Leishmania infantum infection rate in dogs housed in open-admission shelters is higher than of domiciled dogs in an endemic area of canine visceral leishmaniasis. Epidemiological implications

Letícia G.T.M. Estevam^a, Laura B. Veloso^b, Geralda G. Silva^b, Carina C. Mori^a, Paula F. Franco^a, Ana C.V.M. Rocha Lima^a, Gabriela R. Ássimos^a, Ilka A. Reis^c, José D. Andrade-Filho^a, Márcio S.S. Araújo^a, Vitor M. Ribeiro^d, Ana P.M.M. Almeida^{b,1}, Gustavo F. Paz^{a,1,*}

^a Grupo de Estudos em Leishmanioses, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Minas, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Augusto de Lima, Instituto René Rachou, 1715 Barro Preto, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b CEVA Saúde Animal, Juatuba, MG, Brazil

^c Departamento de Estatística, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Hospital Veterinário Santo Agostinho, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Leishmania infantum
Leishmania amazonensis
Open-admission dog shelters
PCR-RFLP
Foci of zoonotic diseases
Seropositivity

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is caused by *Leishmania infantum* and is endemic in many areas of south-eastern Brazil. We have hypothesized that the prevalence of infection by *L. infantum* in dogs housed in open-admission animal shelters is beyond the range of 3.4 - 9.6% reported among dogs domiciled in similar CVL-endemic areas. Hence, this study aimed to determine the rate of *L. infantum* infection among dogs maintained in shelters and to investigate the epidemiology of CVL in such environments by analyzing hematological and biochemical parameters. A total of 627 dogs from 17 different shelters across the State of Minas Gerais were screened using the Dual-Path Platform test and enzyme-linked immunosorbent assay and 211 (33.6%) were found to be seropositive in both tests. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was performed on skin, bone marrow and lymphoid tissues of 118 seropositive dogs with inconclusive CVL clinical diagnosis and, of these, 78 (66.1%) were PCR+ for *L. infantum* and 7 (5.9%) were PCR+ for *L. amazonensis*. One dog presented a PCR-RFLP profile that was consistent with co-infection by both parasites. *Leishmania amazonensis* DNA was detected in skin samples of six single-infected dogs and this constitutes a novel finding. Dogs infected only with *L. amazonensis* were less debilitated than those infected by *L. infantum*, which showed typical clinical manifestations of CVL. The co-infected dog showed only mild clinical signs. The results presented herein not only support our original hypothesis but also suggest that dogs are potential reservoirs of *L. amazonensis*. Public health authorities should acknowledge their responsibility towards animals in collective shelters, recognize that they are potential foci of zoonotic diseases, and establish proper functioning directives to minimize transmission to humans and to other dogs.

1. Introduction

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is distributed throughout Brazil, particularly in the southeastern region where the disease is considered endemic in many areas. The state of Minas Gerais is representative of an endemic area as demonstrated by studies involving serological surveys

among the canine population. According to the most recent investigations, the prevalence rates of CVL among domiciled dogs range from 7.8 to 8.3% (Paz et al., 2018). In Brazil, CVL is caused mainly by the protozoan *Leishmania infantum* and is transmitted through the bites of female sand flies *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) during blood meal. Dogs are the main reservoirs of the parasite in urban areas

* Corresponding author.

E-mail address: gustavo.paz@fiocruz.br (G.F. Paz).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106492>

Received 4 February 2022; Received in revised form 25 April 2022; Accepted 27 April 2022

Available online 29 April 2022

0001-706X/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

and, since they live in close proximity to humans, effective control of CVL is extremely important for the prevention of human visceral leishmaniasis (Gavvani et al., 2002; Quinnell and Courtenay, 2009).

The sand fly vector is distributed widely throughout Brazil, whilst its occurrence in urban areas is well-documented and coincides with diagnosed cases of VL (Andrade-Filho et al., 2017). The presence of the vector is favored by specific environmental conditions such as the presence of organic material and sources of blood for female feeding. Moreover, the risk of human infection is increased significantly in environments populated by *L. infantum*-infected dogs in comparison with settings in which the dog population is predominantly non-infected (Coura-Vital et al., 2011).

In this context, the continuous intake of rescued dogs by open-admission animal shelters is an issue that deserves particular attention because it often generates overpopulated environments. The formation of such canine agglomerations is driven by the reality that most rescued dogs are not suitable for adoption. However, empathy for the plight of the dogs is challenging and comes with a cost, as a consequence of which many animal shelters struggle to find sufficient resources to provide the quality of life required (Patronek, 1999; Cunha et al., 2017). The conglomeration of dogs in confined spaces can contribute to the spread of vector-borne agents and infectious pathogens. Furthermore, in areas that are endemic for CVL, shelters can become foci of parasites for the animals that inhabit them and for neighboring dog populations and human residents, especially children and senior adults (Lima et al., 2012; Soccol et al., 2017).

The literature concerning animal health in shelters environments is scarce and little is known about the prevalence of CVL or of the species of parasites that circulate therein. Animals maintained in sheltered environments are not generally submitted to routine clinical examination and the sites themselves can represent a threat to public health. In this regard, local health authorities should institute measures to control the number of animals that may be accommodated in shelters in accordance with the availability of resources and of responsible caregivers (Rodrigues, 2019).

The tests recommended by the Brazilian Ministry of Health for the detection of CVL are the Dual-Path Platform (DPP) assay for screening and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for confirmation. While both techniques exhibit high sensitivity and specificity for the genus *Leishmania*, there is a need to improve the performance of DPP in the case of asymptomatic animals (Figueiredo et al., 2018; Souza et al., 2019a). Moreover, veterinarians tend to use molecular analyses such as polymerase chain reaction (PCR) alongside serological diagnosis in order to determine the species of *Leishmania* responsible for the infection (Solano-Gallego et al., 2011; BRASILEISH, 2018; Maurelli et al., 2020). Specific diagnosis is important given that *L. braziliensis* and *L. amazonensis*, which are the most common etiological agents of American tegumentary leishmaniasis (ATL) in humans, have already been identified in infected dogs (Dias et al., 2011; Valdivia et al., 2017; Paz et al., 2018).

In the light of the above, we have hypothesized that the prevalence of infection by *L. infantum* in dogs maintained in shelters is higher than that normally found among populations of dogs domiciled in similar CVL-endemic areas. In order to test this hypothesis, the present study aimed: (i) to determine the positivity rate for *L. infantum* among dogs housed in animal shelters using serological and molecular techniques, and (ii) to investigate the epidemiology of CVL in these environments by analyzing hematological and biochemical parameters.

2. Materials and methods

2.1. Ethical statement

Details of the project were submitted to and approved by the Ethics Committee for Animal Research of Nanocore Biotecnologia SA (Campinas, SP, Brazil) under protocol number 224/2018-1.2. All procedures

involving animals were carried out in accordance with the guidelines issued by the Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA; Brasília, DF, Brazil) and with the Federal Law of Brazil (Presidência da República do Brasil, 2008). Signed informed consent forms (ICF) were obtained from the caregivers responsible for the shelters.

2.2. Shelters

Lists of possible shelters located in CVL endemic areas of Minas Gerais were initially provided by government-sponsored zoonosis control centers and non-governmental organizations. Since there are no regulations concerning the minimal infrastructure of animal shelters, the researchers selected those housing ten dogs or more without calculating animal densities. The dog shelters differed with respect to type and size of property, number of animals and sanitary control, but the general visual impression was spaces with very little room for movement (Fig. 1). Although not all persons responsible for the shelters agreed to contribute to the study, a total of 17 expressed their willingness to participate and sign an ICF.

2.3. Study animals, clinical signs and collection of blood and tissue samples

The study was conducted between May and October 2019 and involved 627 dogs residing in animal shelters in the cities of Belo Horizonte, Contagem, Divinópolis, Esmeraldas, Ibirité, Igarapé, Ipatinga, Ribeirão das Neves and Santa Luzia, all of which are located in CVL-endemic areas in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. The criteria for inclusion of animals and shelters were: any dog regardless of breed, age or clinical status, and any shelter with a high dog population (≥ 10 dogs) for which the responsible caregiver willingly expressed agreement with the study objectives by signing the ICF. Samples were not collected from dogs to which the caregivers were especially attached or from aggressive dogs/scared dogs that absconded during sampling visits. Locations, shelter codes and numbers of dogs sampled are shown



Fig. 1. Example of an animal shelter.

in Table 1.

Peripheral blood samples were collected by venipuncture and transferred to vials with or without anticoagulant (ethylenediamine tetraacetic acid) for subsequent analysis of whole blood or serum, respectively. Samples of skin, bone marrow and popliteal lymph node were obtained for molecular analyses as follows: ear tip skin samples were collected by 5 mm diameter punch biopsies; bone marrow samples were collected by sternal puncture and aspiration using 10 mL syringes and 40 × 12 mm needles; and lymph node samples were collected by puncture and aspiration using 3 mL syringes and 25 × 0.8 mm needles. Sampling was performed on seropositive dogs (see Subsection 2.4) presenting non-specific or indiscernible clinical signs of CVL, the diagnosis of which was, therefore, considered inconclusive. Typical clinical signs of CVL were considered to be weight loss, mucosal pallor, lymphadenopathy, presence of wounds, peeling of skin, alopecia and onychogryphosis.

2.4. Serological analysis

DPP® Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and SNAP Leishmania (IDEXX® Laboratories, Westbrook, ME, USA) tests were performed on all 627 dogs for screening and confirmation of CVL, respectively. Dogs were considered seropositive when samples were reactive in both tests.

2.5. Molecular analysis

PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was performed using tissue samples from the 118 seropositive dogs that presented inconclusive diagnosis of CVL. Initially, DNA was extracted from skin and bone marrow but, because of the relatively low detection of *Leishmania* DNA in these tissues, aspiration cytology of popliteal lymph nodes was performed in an attempt to increase the sensitivity of the assay. Skin DNA was extracted using Gentra® Puregene® Cell Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA), while DNA from bone marrow and lymph node was extracted using Invitrogen® PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). All procedures were carried out in accordance with the instructions provided by the manufacturers.

The ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) region of parasite DNA was amplified using *Leishmania*-specific primers [LS.8S (5'-TGA-TACCACCTTATCGC ACTT-3') / LITSR (5'-CTGGATCAT'I-TCCGATG-3')] as described by El Tai et al. (2000). The non-purified amplicons were restricted with HaeIII, resuspended in 10x BlueJuice Gel Loading Buffer (Thermo Fisher Scientific), subjected to electrophoresis on 2%

agarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 100 V and stained with ethidium bromide. The PCR-RFLP banding patterns were compared with the molecular profiles of *Leishmania* reference strains (positive controls), namely *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) and *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) and results expressed as positive (PCR+) or negative (PCR-) for each species (Schonian et al., 2003). Negative controls comprised sterile Milli-Q water instead of *Leishmania* DNA.

2.6. Hematological and biochemical analysis

Whole blood and serum samples from 69 dogs that were positive for the presence of *Leishmania* DNA as determined by PCR-RFLP were subjected to hematological and biochemical analyses. Complete blood count (CBC), which included evaluation of red blood cells (RBC), white blood cells (WBC) and platelets, was carried out using an IDEXX ProCyt Dx Analyzer (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA). Biochemical parameters, including total protein, albumin/globulin ratio, alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), urea and creatinine, were determined using an IDEXX Catalyst One Chemistry Analyzer (IDEXX Laboratories). All analyses were carried out at the Hospital Veterinário Santo Agostinho (Belo Horizonte, MG, Brazil) in accordance with the instructions provided by the manufacture, and recommended reference values were employed in assessing animal health status.

2.7. Data analyses

Descriptive statistics were used to summarize the data set through the construction of frequency tables for categorical variables and the evaluation of measures of central tendency (mean and median) and variability (standard deviation and interquartile distance) for quantitative variables. In order to facilitate the comparison of seropositivity rates between cities, data from all shelters in a single location were combined and submitted to χ^2 test. Results of the PCR-RFLP analyses of skin, bone marrow and lymph node tissues were considered pair wise and an animal was considered PCR+ when *Leishmania* DNA was detected in at least one tissue. Pair complementarity was defined as the percentage of PCR+ pairs in relation to the total number of samples of that particular pair (Paz et al., 2018). Pearson's χ^2 test was used to determine the association between categorical variables. Agreement between serological and molecular tests was evaluated by calculating the 95% confidence interval (CI) of the proportion of PCR+ dogs in relation to the total number of seropositive dogs. In all tests, the level of statistic significance was set at 5% probability.

3. Results

3.1. Serological diagnosis

A total of 627 dogs were screened for the presence of anti-*Leishmania* antibodies and 211 (33.6%) were reactive in both the DPP and ELISA tests (Table 2). Ninety-three (44.1%) of the seropositive animals presented typical signs and symptoms of CVL affirming conclusive diagnoses, while 118 (55.9%) had non-specific or mild clinical signs of the disease and the diagnoses were considered inconclusive. Shelters in the nine different locations in Minas Gerais were similar with respect to their seropositivity rates.

PCR-RFLP analysis of tissue samples from dogs with inconclusive diagnoses of CVL resulted in the detection of *Leishmania* DNA in 44.1% (52/118) of skin, 39.7% (46/116) of bone marrow and 52.3% (34/65) of lymph node samples, with the latter tissue showing the highest positivity. It was not possible to collect bone marrow from two dogs and it was only practicable to obtain lymphoid materials from 65 animals. Nevertheless, by combining the results of tissue pairs, the skin/lymph node pair was found to be best for the detection of tissue-resident

Table 1
Shelters located in cities in the state of Minas Gerais, Brazil, selected for inclusion in the study and the number of dogs sampled.

Location	Shelter code	Number of dogs
Belo Horizonte (19° 55'S; 43° 56'W)	S1	37
	S2	10
	S3	14
	S4	51
Divinópolis (20° 08'20"S; 44° 53'02"W)	S5	24
	S6	20
Esmeraldas (19° 45'46"S; 44° 18'47"W)	S7	21
	S8	19
	S9	32
Ibirité (20° 01'32"S; 44° 03'7"W)	S10	28
	S11	17
Igarapé (20° 04'01"S; 44° 18'07"W)	S12	30
	S13	54
Ipatinga (19° 28'46"S; 42° 31'18"W)	S14	45
	S15	23
Ribeirão das Neves (19° 46'01"S; 44° 05'13"W)	S16	95
Santa Luzia (19° 78'4"S; 43° 94'02"W)	S17	107
Total		627

Table 2
Rates of seropositivity among dogs housed in various animal shelters across the State of Minas Gerais.

Location	Shelter codes	Seronegative dogs		Seropositive dogs ^a
		DPP- n (%)	DPP+/ELISA- n (%)	DPP+/ELISA + n (%)
Belo Horizonte (n = 37)	S1	21 (56.8)	6 (16.2)	10 (27.0)
Contagem (n = 75)	S2/S3/S4	36 (48.0)	14 (18.7)	25 (33.3)
Divinópolis (n = 44)	S5/S6	22 (50.0)	11 (25.0)	11 (25.0)
Esmeraldas (n = 72)	S7/S8/S9	36 (50.0)	15 (20.8)	21 (29.2)
Ibirité (n = 75)	S10/S11/S12	47 (62.7)	4 (5.3)	24 (32.0)
Igarapé (n = 54)	S13	32 (59.3)	1 (1.9)	21 (38.9)
Ipatinga (n = 68)	S14/S15	31 (45.6)	9 (13.2)	28 (41.2)
Ribeirão das Neves (n = 95)	S16	48 (50.5)	11 (11.6)	36 (37.9)
Santa Luzia (n = 107)	S17	58 (54.2)	14 (13.1)	35 (32.7)
Total (n = 627)	S1 – S17	331 (52.8)	85 (13.6)	211 (33.6)

Abbreviations: DPP, dual-path platform; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

^a According to χ^2 test there were no significant differences ($P < 0.05$) between the locations with respect to seropositivity rates

parasites with a pair complementarity of 32.3%, followed by bone marrow/lymph node and skin/bone marrow with pair complementarity of 25.0% and 17.2%, respectively.

3.2. PCR-RFLP analysis

Assessment of the agreement between the serological and molecular methods employed to diagnose clinically inconclusive animals showed that 72.9% (86/118) of samples that tested seropositive for *Leishmania* were also PCR+, implying a moderate congruency that was significantly higher (95% CI = 0.632 – 0.801) than the random prediction of 50%. In this sense, positive samples in serology tended to be confirmed by subsequent PCR.

PCR-RFLP analysis of skin, bone marrow and lymphoid tissues showed that 66.1% (78/118) of the dogs were positive solely for *L. infantum* DNA while 5.9% (7/118) were positive exclusively for *L. amazonensis* DNA (Fig. 2; Table 3). One dog presented co-infection by both parasites in that *L. infantum* was detected in skin tissue and *L. amazonensis* in lymph node tissue. The eight dogs that were infected by *L. amazonensis* were housed in different shelters/locations with four from S16 (Ribeirão das Neves), two from S9 (Esmeraldas), one each from S10 (Ibirité) and S17 (Santa Luzia), the latter being the dog presenting co-infection.

3.3. Clinical pathological findings

Table 4 shows the hematological and biochemical alterations found in dogs that were PCR+ exclusively for *L. infantum* or *L. amazonensis* DNA. The co-infected dog exhibited thrombocytopenia, hyperproteinemia and low ALP activity.

4. Discussion

Literature relating to domestic animals housed in collective shelters is scarce, and little or no information is available concerning the pathogens that may be present in these environments. The population of dogs in collective shelters is high because of the constant intake of unwanted

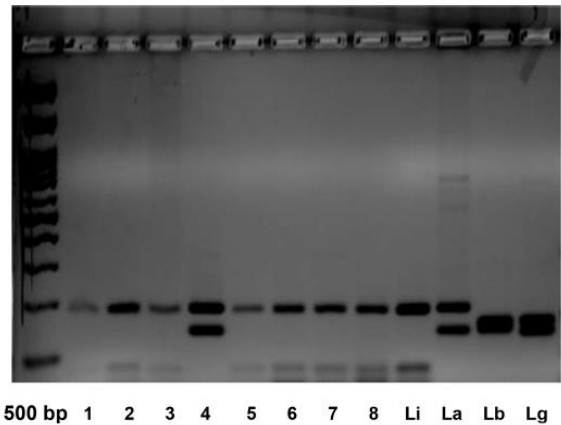


Fig. 2. PCR-RFLP analysis of canine bone marrow tissues. PCR amplification of the internal transcribed spacer (ITS1) followed by digestion with HaeIII. Products were analyzed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Lanes: molecular-weight ladder 500pb; 1-3 and 5-8, positive samples for *Leishmania infantum*; 4, positive sample for *L. amazonensis*; products of reference strains: Li, *L. infantum*; La., *L. amazonensis*; Lb., *L. brasiliensis*; Lg., *L. guyanensis*. The gel refers to dogs from shelter S17 where animals infected with both *L. infantum* and *L. amazonensis* were found.

Table 3

Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of canine skin, bone marrow and lymph node tissue samples.

Target species/tissue	<i>Leishmania</i> DNA PCR- n (%)	PCR + n (%)	Total N
<i>L. infantum</i>			
Skin	72 (61.0)	46 (39.0)	118
Bone marrow	71 (61.2)	45 (38.9)	116
Lymph node	32 (49.2)	33 (50.8)	65
<i>L. amazonensis</i>			
Skin	112 (94.9)	6 (5.1)	118
Bone marrow	115 (99.1)	1 (0.9)	116
Lymph node	64 (98.5)	1 (1.5)	65

Table 4

Hematological and biochemical alterations found in dogs that were polymerase chain reaction positive (PCR+) for a single species of *Leishmania* DNA.

Hematological / biochemical parameters	Dogs PCR+ for <i>L. infantum</i> (n = 61)	Dogs PCR+ for <i>L. amazonensis</i> (n = 7)
Alterations in complete blood count n (%)		
Low RBC/hemoglobin (anemia)	26 (42.6)	0
Low platelet count (thrombocytopenia)	22 (36.1)	1 (14.3)
High platelet count (thrombocytosis)	9 (14.8)	3 (42.9)
Low WBC count (leukopenia)	5 (8.2)	0
High WBC count (leukocytosis)	9 (14.8)	0
Alterations in biochemical status n (%)		
Hyperproteinemia	38 (62.3)	1 (14.3)
Low albumin/globulin ratio	32 (52.5)	1 (14.3)
Low ALP	17 (27.9)	2 (28.6)
High ALT	12 (19.7)	2 (28.6)
High urea	8 (13.1)	0
High creatinine	4 (6.6)	0

Abbreviations: ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; RBC, red blood cells; WBC, white blood cell.

animals and the low rates of adoption, and such conditions can lead to a reduction in the level of well-being that may generate increased stress in the animals (Barnard et al., 2016). However, the considerable differences that exist among animal shelters with regard to infrastructure and quality of management render it difficult to make comparisons between the facilities, except for the high dog population (Cuglovici and Amaral, 2021). The extremely close coexistence of dogs favors the transmission of diseases since the stressful conditions weaken the immune system of the animals and there is little or no control over the spread of pathogens amongst them.

This study is the first to focus specifically on *Leishmania* infection among dogs housed in shelters located in areas endemic for CVL. Moreover, most of the studied shelters were located in areas that favored the presence of the sand fly vector because of the presence of organic material and adjacent forested or unoccupied land. In addition, sheltered dogs were typically housed in external areas where the probability of being bitten by sand flies was high and the risk of infection was around twice that of animals housed inside a domicile (Coura-Vital et al., 2011). Overall, the studied shelters afforded abundant food sources and excellent environmental conditions for the growth of insect-vector populations and ectoparasites and, for these reasons, would likely be important foci for the propagation of hemopathogens to neighboring areas.

The results obtained in our investigation revealed that the numbers of *L. infantum*-infected dogs in animal shelters within CVL endemic areas can be many times higher than among domiciled animals. For example, the overall seropositivity rate of 33.6% detected in our census was up to 10-fold greater than the values of 3.4 to 9.6% found in previous studies involving dogs domiciled in similar CVL endemic areas (Lopes et al., 2017; Rocha et al., 2020). On this basis, it is suggested that shelters are conducive to the maintenance and propagation of *L. infantum* and, therefore, require implementation of CVL control measures.

The DPP and ELISA tests used in this study are those recommended by the Program of Surveillance and Control of Visceral Leishmaniasis sponsored by the Brazilian Ministry of Health. However, these serological assays are not able to identify the etiological agent precisely, and the occurrence of cross-reactivity between different *Leishmania* species may lead to an overestimation of *L. infantum* infections (Paz et al., 2018; Souza et al., 2019b). This important deficiency of serology could be observed in the present study in which PCR confirmed *L. infantum* infection in the majority of seropositive dogs but also revealed that some animals were actually infected by *L. amazonensis*. Considering that only dogs with inconclusive clinical diagnoses were submitted to molecular tests, it is likely that a higher number of animals could be infected with *L. infantum* and/or *L. amazonensis*. In areas where mixed infections may occur, molecular analyses are particularly important for seropositive dogs with inconclusive diagnoses since these tests can confirm infection and also distinguish the species of *Leishmania*, thus facilitating decision-making regarding monitoring and management of the animals. However, correct molecular diagnoses depend on the suitability of the biological samples.

Our study has shown that, among the tissues collected for molecular diagnoses, lymphoid material presented the highest rate (>50%) of PCR+ results for *L. infantum* DNA. It is likely that this rate would have been even higher if it was not for the difficulty of sampling lymph nodes, especially when they are not palpable. Other researchers have also identified lymphoid material as appropriate for detecting tissue-resident *L. infantum* DNA (Maia et al., 2009; Marcelino et al., 2020). However, in the present study, parasitic DNA could also be detected in both skin and bone marrow tissue, albeit at lower rates. It is important, therefore, to emphasize the necessity of using more than one sample for the molecular diagnosis of CVL in routine clinical practice, noting that the best results were obtained in our survey with lymph node and skin tissues. Additionally, these two tissue types may remain PCR+ even after therapeutic intervention, in which case they would be important for monitoring parasite load (Manna et al., 2004). In this context, Giunchetti

et al., 2008 showed that the parasitic loads of dogs with mild clinical symptoms were similar to those of dogs with severe symptoms.

We report here for the first time the detection of *L. amazonensis* in canine skin samples, a finding that is particularly significant because it suggests a role of dogs in the epidemiology of ATL. If future studies confirm that dogs are indeed reservoirs of *L. amazonensis*, it will be necessary to determine whether there is an increase in the risk of human infection by this parasite because of the close contact between dogs and humans (Nunes et al., 2010; Coura-Vital et al., 2011). Hitherto, *L. amazonensis* has been described in canine lymph nodes, bone marrow and conjunctival swab samples but not in skin tissue (Dias et al., 2011; Valdivia et al., 2017; Paz et al., 2018; Souza et al., 2019b). Another aspect that requires further investigation relates to the putative vectors of this parasite in the studied areas, since the circulating phlebotomine species may be amenable to *L. amazonensis*. The main vector of this particular parasite is the sand fly *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *flaviscutellata*, a non-anthropophilic species found mainly in the Amazon region (Ward et al., 1973; Arias et al., 1987). Souza et al. (2019b) has already drawn attention to the possible urbanization of *L. amazonensis*, and our results provide further evidence about this perspective.

The hematological and biochemical alterations found in dogs infected solely by *L. infantum* were more extensive, but not more serious, than those of dogs infected exclusively by *L. amazonensis*. The CBC and biochemical parameters of *L. infantum*-infected dogs were typical of CVL and included normocytic normochromic anemia, a condition that is common in chronic infectious diseases involving bone marrow depression, together with hyperproteinemia and hypergammaglobulinemia resulting in a reduction in the albumin/globulin ratio and renal azotemia (Solano-Gallego et al., 2011). Considering the clinical and laboratory results obtained and the observation that *L. amazonensis*-infected dogs were less debilitated than those infected by *L. infantum*, we suggest that the latter is generally more detrimental to the health of dogs. This finding diverges from previous reports indicating that *L. amazonensis* produces severe clinical signs and suggesting a link with CVL (Sanches et al., 2016; Valdivia et al., 2017). It is important to emphasize that the hematological and biochemical changes of the dogs housed in shelters could be influenced by many factors including poor nutrition, coinfection with other pathogens and stress. Nevertheless, there is a knowledge gap regarding canine infection by *L. amazonensis* and many aspects require clarification, particularly with respect to disease progression and the potential role of dogs as reservoirs of the parasite. Furthermore, it is important to highlight that these dogs living in shelters, so the animal nutrition, coinfection with other pathogens, stress and other factors associated can influence in hematological and biochemical changes.

In the present study, one dog was found to be co-infected by *L. amazonensis* and *L. infantum*, with the DNA of the former having been detected in the lymphoid node and that of the latter in skin tissue. This finding is in accord with the observation of Madeira et al. (2006) that, in mixed infection by *L. braziliensis* and *L. infantum*, the parasite species are found in different organs. The co-infected animal described herein presented minor hematological and biochemical alterations and, similarly to the other dogs investigated in this study, exhibited mild clinical symptoms. These results suggest that co-infection by two species of parasites does not necessarily exacerbate CVL. However, it is not possible to draw any general conclusions from this result because only one animal was co-infected. In previously described cases of co-infection by *L. infantum* and *L. amazonensis*, the animals presented clinical symptoms similar to those found in dogs diagnosed with CVL (Tolezano et al., 2007; Sanches et al., 2016). However, according to Pires et al. (2014), some animals co-infected by *L. infantum* and *L. braziliensis* exhibited no clinical signs of disease while others presented cutaneous lesions.

5. Conclusions

The use of a PCR-based technique was essential in discriminating between *L. infantum*- and *L. amazonensis*-infected dogs and in identifying co-infected animals. The detection of *L. amazonensis* in canine skin samples suggested that dogs may be reservoirs of this protozoan species. Hematological and biochemical analysis showed that the clinical manifestations of disease in an animal co-infected by *L. infantum* and *L. amazonensis* were not more severe than in single-infected animals, although the epidemiology of single-infection by *L. amazonensis* and co-infection by *L. infantum* and *L. amazonensis* requires further research.

The results presented herein support our hypothesis that the prevalence of *L. infantum* is higher in animal shelters than the observed in domiciled dogs in CVL endemic areas. Public health authorities should acknowledge their responsibility for the protection and well-being of animals in collective shelters, recognize that they are potential foci of zoonotic diseases, and establish proper functioning directives. Hitherto, such responsibility lies with individuals and the rescue organizations that operate without financial support and without any formal regulations or accountability.

Data availability statement

Raw data were generated at Instituto René Rachou, FIOCRUZ Minas. Derived data supporting the findings of this study are available from the corresponding author [GFP] on request.

CRedit authorship contribution statement

Leticia G.T.M. Estevam: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Laura B. Veloso:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Supervision, Writing – review & editing. **Gerarda G. Silva:** Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Carina C. Mori:** Investigation, Writing – review & editing. **Paula F. Franco:** Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Ana C.V.M. Rocha Lima:** Investigation, Writing – review & editing. **Gabriela R. Ássimos:** Investigation, Writing – review & editing. **Ilka A. Reis:** Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **José D. Andrade-Filho:** Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Project administration, Supervision, Writing – review & editing. **Márcio S.S. Araújo:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Writing – review & editing. **Vitor M. Ribeiro:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Writing – review & editing. **Ana P.M.M. Almeida:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Gustavo F. Paz:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; grant no. CVZ-APQ-02526-16) and CEVA Saúde Animal. The authors acknowledge editorial assistance from

Edizione Editoração Ltda (www.edizione.com).

References

- Andrade-Filho, J.D., Scholte, R.G.C., Amaral, A.L.G., Shimabukuro, P.H.F., Carvalho, O. S., Caldeira, R.L., 2017. Occurrence and probability maps of *Luomyia longipalpis* and *Luomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *J. Med. Entomol.* 54 (5), 1430–1434. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx094>.
- Arias, J.R., Freitas, R.A., Naiff, R.D., Barrett, T.V., 1987. Observations on the parasite *Leishmania mexicana amazonensis* and its natural infection of the sand fly *Luomyia olmeca nociva*. *Bull. Pan Am. Health Organ.* 21 (1), 48–54. Available at: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/27855/ev21n1p48.pdf> (Accessed 22 November 2021).
- Barnard, S., Pedernera, C., Candeloro, L., Ferri, N., Velarde, A., Villa, Dalla, 2016. Development of a new welfare assessment protocol for practical application in long-term dog shelters. *Vet. Rec.* 178 (1), 18. <https://doi.org/10.1136/vr.103336>.
- BRASILEISH, 2018. Diretrizes para diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose Canina. Grupo de estudos sobre leishmaniose animal. <https://www.brasileish.com.br/revistadiretriz.html> (Accessed 25 March 2022).
- Coura-Vital, W., Marques, M.J., Veloso, V.M., Roatt, B.M., Aguiar-Soares, R.D.O., Reis, L. E.S., Braga, S.L., Moraes, M.H.F., Reis, A.B., Carneiro, M., 2011. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (8), e1291. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001291>.
- Cugliovici, D.A., Amaral, P.I.S., 2021. Dog welfare using the shelter quality protocol in long-term shelters in Minas Gerais State, Brazil. *J. Vet. Behav.* 45, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2021.06.004>.
- Cunha, G.R., Martins, C.M., Ceccon-Valente, M.F., Silva, L.L., Martins, F.D., Floeter, D., Robertson, J.V., Ferreira, F., Biondo, A.W., 2017. Frequency and spatial distribution of animal and object hoarder behavior in Curitiba, Paraná state, Brazil. *Cad. Saude Pub.* 33 (2), e00001316 <https://doi.org/10.1590/0102-311x00001316>.
- Dias, E.S., Regina-Silva, S., França-Silva, J.C., Paz, G.F., Michalsky, E.M., Araújo, S.C., Valadao, J.L., Lara-Silva, F.O., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., Fortes-Dias, C.L., 2011. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.* 176 (2–3), 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.014>.
- El Tai, N.O., Osman, O.F., El Fari, M., Presber, W., Schönian, G., 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94 (5), 575–579. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90993-2](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90993-2).
- Figueiredo, F.B., Vasconcelos, T.C.B., Madeira, M.F., Menezes, R.C., Maia-Elkhoury, A.N. S., Marcelino, A.P., Werneck, G.L., 2018. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113 (11), e180260. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180260>.
- GavGANI, A.S.M., Hodjati, M.H., Mohite, H., Davies, C.R., 2002. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched cluster randomised trial. *Lancet* 360, 374–379. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09609-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09609-5).
- Giunchetti, R.C., Martins-Filho, O.A., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Marques, M.J., Tafuri, W.L., Correa-Oliveira, R., Reis, A.B., 2008. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121 (1–2), 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.07.009>.
- Lima, I.D., Queiroz, J.W., Lacerda, H.G., Queiroz, P.V.S., Pontes, N.N., Barbosa, J.D.A., Martins, D.R., Weirather, J.L., Pearson, R.D., Wilson, M.E., Jeronimo, S.M.B., 2012. *Leishmania infantum chagasi* in Northeastern Brazil: asymptomatic infection at the urban perimeter. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86 (1), 99–107. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.10-0492>.
- Lopes, J.V., Michalsky, E.M., Lara-Silva, F.O., Lima, A.C.V.M.R., Avelar, D.M., Junior da Costa, A.A., França-Silva, J.C., Regina-Silva, S., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S., 2017. Seroprevalence and molecular characterization of *Leishmania* in dogs from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 5 (2017), 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.02.002>.
- Madeira, M.F., Schubach, A., Schubach, T.M.P., Pacheco, R.S., Oliveira, F.S., Pereira, S. A., Figueiredo, F.B., Baptista, C., Marzochi, M.C.A., 2006. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) brasiliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100 (5), 442–445. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.07.011>.
- Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J.M., Gonçalves, L., Campino, L., 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet. J.* 179 (1), 142–144. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.009>.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caraccappa, S., Pavone, L.M., Morte, R.D., Cringoli, G., Staiano, N., Gravino, A.E., 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 125 (3–4), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.019>.
- Marcelino, A.P., Souza Filho, J.A., Bastos, C.V., Ribeiro, S.R., Medeiros, F.A.C., Reis, I.A., Rocha Lima, A.C.V.M., Barbosa, J.R., Paz, G.F., Gontijo, C.M.F., 2020. Comparative PCR-based diagnosis for the detection of *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Acta Trop.* 207, 105495. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105495>.
- Maurelli, M.P., Bosco, A., Manzillo, V.F., Vitale, F., Giaquinto, D., Ciucca, L., Molinaro, G., Cringoli, G., Oliva, G., Rinaldi, L., Gizzarelli, M., 2020. Clinical, molecular and serological diagnosis of canine leishmaniasis: an integrated approach. *Vet. Sci.* 7, 43. <https://doi.org/10.3390/vetsci7020043>.

- Nunes, C.M., Pires, M.M., Silva, K.M., Assis, F.D., Gonçalves Filho, J., Perri, S.H.V., 2010. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet. Parasitol.* 170 (1–2), 131–133. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.044>.
- Patronek, G.J., 1999. Hoarding of animals: an under-recognized public health problem in a difficult-to-study population. *Public Health Rep.* 114 (1), 81–87, 1999. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1308348/pdf/pubhealthrep00029-0083.pdf> (Accessed 22 November 2021).
- Paz, G.F., Rugani, J.M.N., Marcelino, A.P., Gontijo, C.M.F., 2018. Implications of the use of serological and molecular methods to detect infection by *Leishmania* spp. in urban pet dogs. *Acta Trop.* 182, 198–201. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.03.018>.
- Presidência da República, 2008. Lei No. 11.794, de 8 de Outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm.
- Pires, M.Q., Madeira, M.F., Bittencourt, V.R.E.P., Pacheco, R.S., 2014. Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47 (2), 243–246. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0007-2013>.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136 (14), 1915–1934. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991156>.
- Rocha, M.F., Michalsky, E.M., Lara-Silva, F.O., Valadão, J.L., França-Silva, J.C., Pinheiro, L.C., Souza, J.F., Santos, R.C., Soares, M.D., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S., 2020. Dogs with divergent serology for visceral leishmaniasis as sources of *Leishmania* infection for *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies – an observational study in an endemic area in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14 (2), e0008079 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008079>.
- Rodrigues, C.M., 2019. Animal accumulators from the perspective of health promotion and surveillance. *ABCS Health Sci.* 44 (3), 195–202. <https://doi.org/10.7322/abcshs.v44i3.1394>.
- Sanches, L.C., Martini, C.C., Nakamura, A.A., Santiago, M.E.B., Lima, B.D., Lima, V.M.F., 2016. Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 25 (4), 465–469. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016071>.
- Schonian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H.D.F.H., Presber, W., Jaffe, C., 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 47 (1), 349–358. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00093-2).
- Socol, V.T., Pasquali, A.K.S., Pozzolo, E.M., Leandro, A.S., Chiyo, L., Baggio, R.A., Michaliszyn, M.S., Silva, C., Cubas, P.H., Peterle, R., Paz, O.L.S., Belmonte, I.L., Bisetto-Junior, A., 2017. More than the eyes can see: the worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. *PLoS One* 12 (12), e0189182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189182>.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites Vectors* 4, 86. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>.
- Souza, C.S.F., Silva, V.L., Labarthe, N., 2019a. Evaluation of DPP® and SNAP® rapid tests for diagnosis of *Leishmania infantum* canine infections. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 52, e20190154 <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0154-2019>.
- Souza, N.A., Leite, R.S., Silva, S.O., Penna, M.G., Vilela, L.F.F., Melo, M.N., Andrade, A.S.R., 2019b. Detection of mixed *Leishmania* infections in dogs from an endemic area in southeastern Brazil. *Acta Trop.* 193, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.016>.
- Tolezano, J.E., Uliana, S.R.B., Taniguchi, H.H., Araújo, M.F.L., Barbosa, J.A.R., Barbosa, J.E.R., Floeter-Winter, L.M., Shaw, J.J., 2007. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 149 (3–4), 280–284. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.008>.
- Valdivia, H.O., Almeida, L.V., Roatt, B.M., Reis-Cunha, J.L., Pereira, A.A.S., Gontijo, C., Fujiwara, R.T., Reis, A.B., Sanders, M.J., Cotton, J.A., Bartholomeu, D.C., 2017. Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. *Sci. Rep.* 7, 40804. <https://doi.org/10.1038/srep40804>.
- Ward, R.D., Shaw, J.J., Lainson, R., Fraiha, H., 1973. Leishmaniasis in Brazil: VIII. Observations on the phlebotomine fauna of an area highly endemic for cutaneous leishmaniasis, in the Serra dos Carajás, Pará state. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 67 (2), 174–183. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(73\)90142-9](https://doi.org/10.1016/0035-9203(73)90142-9).

Anexo

Anexo I – Parecer do Comitê de Ética de Uso Animal

	<p>Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência</p>	
LICENÇA		LW-14/17
<p>Certificamos que o protocolo (P-22/16-2), intitulado "Avaliação da capacidade vetorial de <i>Ctenocephalides felis felis</i> (Siphonaptera: Pulicidae) na transmissão de <i>Leishmania infantum</i> para <i>Canis familiaris</i>: estudos de infectividade do hospedeiro para o vetor", sob a responsabilidade de GUSTAVO FONTES PAZ, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.</p>		
<p>Esta licença tem validade até 15/05/2020 e inclui o uso total de :</p>		
<p><i>Canis familiaris</i> - 30 Machos.</p>		
<p>Rio de Janeiro, 15 de maio de</p>		
	<p>Octavio Augusto França Presgrave Coordenador da CEUA</p>	
<p>Etelcia M. Molinaro Vice - Coordenadora CEUA/FIOCRUZ SIAPE 0463096 15/05/2017</p>	<p>Octavio A. F. Presgrave Coordenador CEUA/FIOCRUZ SIAPE 04628550</p>	
<p>Comissão de Ética no Uso de Animais Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ Telefone: (21) 3862.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br</p>		