ISOLAMENTO DE *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* EM CÃO COM POLIARTRITE NO MUNICÍPIO DE ARAGUAÍNA, TOCANTINS: RELATO DE CASO

Taiã Mairon Peixoto Ribeiro¹, Samara Rocha Galvão¹, Sebastiana Adriana Pereira Sousa², Thássia Silva Reis¹, Helcileia Dias Santos¹

¹Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, Tocantins.

²Instituto de Estudos do Trópico Úmido, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Xinguara, Pará.

E-mail do autor para correspondência: ribeiro.vet@uft.edu.br

Recebido em: 15/08/2021 – Aprovado em: 15/09/2021 – Publicado em: 30/09/2021

DOI: 10.18677/EnciBio_2021C27

trabalho licenciado sob licença [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

RESUMO

As leishmanioses são enfermidades de potencial zoonótico causadas pelos protozoários *Leishmania* spp., que são transmitidos por fêmeas de flebotomíneos infectadas. O presente estudo teve por objetivo descrever o quadro clínico e laboratorial de leishmaniose visceral e relatar o isolamento de *Leishmania* spp. de baço e fígado em um espécime canino admitido na Clínica Veterinária Universitária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins no ano de 2015. O animal apresentou quadro de claudicação e dor nas articulações calcânea direito e esquerda, na articulação metacarpiana do membro anterior direito e na articulação fêmoro-tíbio-patelar. Foi realizada a punção aspirativa por agulha fina do linfonodo poplíteo e pré-escapular do animal para exame parasitológico direto para *Leishmania* spp. Após a confirmação da presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. no exame parasitológico, o animal foi submetido à eutanásia e necropsia. Foi ainda realizado o diagnóstico molecular pela técnica de reação em cadeia da polimerase, constatando a infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Amostras coletadas de baço e fígado foram inoculadas em Meio Grace, apresentando crescimento significativo de formas promastigotas de *Leishmania* sp. após quatro dias de incubação. Portanto, observou-se a presença de quadro de poliartrite em paciente canino no município de Araguaína e que as técnicas parasitológicas, moleculares e microbiológicas podem ser utilizadas no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães.

PALAVRAS-CHAVE: leishmaniose, líquido sinovial, imunocomplexos.

ISOLATION OF *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* IN DOG WITH POLYARTHRITIS IN THE CITY OF ARAGUAÍNA, TOCANTINS: CASE REPORT

ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases with zoonotic potential caused by the protozoan *Leishmania* spp., which are transmitted by infected female phlebotomines. The present study aimed to describe the clinical condition and laboratory of visceral leishmaniasis and to report the isolation of *Leishmania* spp. from spleen and liver of a canine specimen admitted to the University Veterinary Clinic of the School of Veterinary Medicine and Zootecnics of the Federal University of Tocantins in 2015. The animal presented a condition of lameness and pain in the right and left calcaneal joints, in the metacarpal joint of the right forelimb and in the femoral-tibio-patellar joint. Fine-needle aspiration puncture of the animal's popliteal and pre-scapular lymph nodes was performed for direct parasitological examination for *Leishmania* spp. After confirming the presence of amastigote forms of *Leishmania* spp. in the parasitological examination, the animal was submitted to euthanasia and necropsy. Molecular diagnosis was also performed using the polymerase chain reaction technique, verifying an infection by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Samples collected from spleen and liver were inoculated in Grace medium, with a significant increase in promastigote forms of *Leishmania* sp. after four days of incubation. Therefore, it was observed the presence of polyarthritis in a canine patient in the city of Araguaína and that parasitological, molecular and microbiological techniques can be used in the diagnosis of visceral leishmaniasis in dogs.

KEYWORDS: leishmaniasis, synovial fluid, immune complexes.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral ou calazar (LV) é uma zoonose considerada de alta letalidade sem um diagnóstico rápido e tratamento deficitário, sendo ainda determinada como uma doença tropical negligenciada (BEJANO *et al.*, 2021; SILVEIRA *et al.*, 2021). É causada por protozoários do gênero *Leishmania* spp. e transmitida principalmente por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* spp. (ZIEMNICZAK *et al.*, 2021). O vetor de *Leishmania* spp. tem um raio de 100 metros de dispersão em sua maior proporção, contudo pode chegar a maiores distâncias dependendo das condições e obstáculos ambientais (GALVIS-OVALLOS *et al.*, 2018). A espécie canina é considerada o reservatório mais importante da leishmaniose no espaço urbano, embora animais silvestres também venham sendo identificados como reservatórios (TRAVI *et al.*, 2018).

Os métodos recomendados pelo Ministério da Saúde no Brasil para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) incluem a utilização do teste imunocromatográfico (Dual Path Platform technology-DPP) como exame de triagem e do ensaio imunoenzimático (ELISA) como teste confirmatório (SILVA *et al.*, 2016).

O método parasitológico como recurso diagnóstico oferece especificidade de aproximadamente 100% e constitui uma opção adequada a locais com menor infraestrutura para execução de exames sorológicos, moleculares e microbiológicos (LAURENTI *et al.*, 2009; BRAZ *et al.*, 2014). Existe, no entanto, a limitação da determinação da espécie-específica, uma vez que as diferentes espécies do gênero *Leishmania* spp. produzem formas amastigotas semelhantes, sendo possível a diferenciação apenas por métodos moleculares.

Os métodos moleculares apresentam boa sensibilidade e especificidade, especialmente os *primers* que utilizam o DNA de minicírculo de kinetoplasto (kDNA), sendo bastante úteis no diagnóstico da LVC em estágios clínicos iniciais e em cães sem sinais clínicos (FERNANDES *et al.*, 2019). Entretanto, ainda não há um consenso nacional e internacional sobre a padronização do protocolo de diagnóstico molecular da LVC em cães (GALLUZI *et al.*, 2018).

O isolamento de *Leishmania* spp. em cultivo depende de condições estéreis de coleta e a necessidade de manutenção em estufas microbiológicas de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) em média a aproximadamente 25° C, podendo ser cultivada nos meios *Grace*, *Roswell Park Memorial Institute* (RMPI 1640) e *Novy-MacNeal-Nicolle* (NNN) (SANTOS *et al.*, 2018; SIRIPATTANAPIPONG *et al.*, 2019).

Atualmente o controle da LV se baseia em medidas de vigilância ativa e passiva focadas no controle populacional de cães no espaço urbano, bem como na eutanásia de cães sorologicamente positivos, inquéritos amostrais periódicos e monitoramento dos vetores (COSTA *et al.*, 2020). Atualmente já se encontra disponível em território brasileiro a opção do tratamento da LVC com o princípio ativo Miltefosina (ARAÚJO *et al.*, 2018). O objetivo do presente estudo é relatar um caso clínico de leishmaniose visceral canina com sinais de poliartrite, além de descrever o isolamento e detecção molecular de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi*.

RELATO DO CASO

Foi atendida no dia 05 de novembro de 2015 na Clínica Veterinária Universitária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins (CVU-EMVZ/UFT), cadela, sem raça definida, fêmea, cinco meses de idade, sete quilos, porte mediano, proveniente do município de Araguaína, Tocantins, Brasil. Na anamnese, foi informado pelo tutor de que a queixa principal eram constantes dores nas patas dianteiras e traseiras, claudicação em dois membros e episódios de incapacidade de se levantar devido às dores nas articulações. O animal apresentava os sinais há quinze dias, segundo o tutor.

O animal havia sido adotado há 45 dias antes do atendimento no CVU-EMVZ/UFT em eventos de adoção promovido por entidade de proteção animal. O tutor foi orientado a realizar exames prévios para constatação de doenças endêmicas na região no momento da adoção para não incorrer em prejuízo a sua saúde e dos animais contactantes.

No exame clínico o animal apresentou mucosas normocoradas, frequência cardíaca e pulmonar de acordo com os padrões de referência para a espécie e idade, linfonodos submandibulares, pré-escapulares e poplíteos aumentados, aumento de volume do baço, desidratado, magro, pelame com opacidade, magro, com dificuldade de locomoção, vocalização de dor ao caminhar, com sensibilidade no calcâneo direito e esquerdo, além do aumento de volume e sensibilidade na região metacarpiana do membro anterior direito, nas articulações calcânea direito e esquerda, e na articulação fêmoro-tíbio-patelar constatando-se, portanto de poliartrite. Observou-se ainda esplenomegalia na palpação abdominal.

Em virtude da região norte do Tocantins ser área endêmica para leishmaniose o animal foi submetido à punção aspirativa por agulha fina dos linfonodos poplíteos e submandibulares seguido do exame parasitológico de *Leishmania* spp. Hemograma e exames bioquímicos (aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, ureia, creatinina, proteína total e frações) também foram solicitados.

Os exames foram recebidos um dia após a consulta clínica no HVU-EMVZ/UFT, sendo administrado durante este período cloridrato de Tramadol (3mg/Kg/PO/TID). O exame radiográfico somente seria solicitado caso o animal fosse negativo ao exame parasitológico para *Leishmania* spp.

Foram observadas: anemia normocítica hipocrômica, linfocitose e trombocitopenia e aumento sérico de ureia no exame bioquímico. No exame parasitológico foi observada grande quantidade de formas amastigotas características de *Leishmania* spp. (corpúsculos de Donovan), classificado pelo Laboratório de Parasitologia Veterinária da EMVZ/UFT como altamente parasitado, que ocorre quando mais de sete formas amastigotas são encontradas em um campo microscópico.

O tutor foi então comunicado na segunda consulta (retorno) que a leishmaniose canina era uma zoonose, e que constituía um risco para a saúde pública e animal. A eutanásia do cão foi recomendada ao tutor, visto que o tratamento foi inviabilizado por não existir produto registrado para o tratamento em cães, em território brasileiro na época do atendimento. Após o consentimento do tutor com o método recomendado, procedeu-se à eutanásia do animal de acordo com a legislação vigente.

Após a eutanásia foi realizada a necropsia, e foi constatado macroscopicamente que o baço estava aumentado de volume, além da poliartrite nos membros anteriores e posteriores. Microscopicamente foram observadas formas amastigotas de *Leishmania* spp. em *imprint* do tecido esplênico, em esfregaço da medula obtida por punção no trocanter maior do fêmur e pela artrocentese do líquido sinovial da articulação fêmoro-tíbio-patelar.

Amostras de baço, fígado, medula e líquido sinovial foram retirados para inoculação em Meio Grace e incubação a 25°C. Foram visualizadas formas promastigotas no quarto dia pós-inoculação apenas na amostra retirada do baço e fígado.

Amostras do tecido hepático obtidas durante a necropsia do animal foram submetidas à extração de DNA pelo *Kit GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep* (Sigma-Aldrich®, United States), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, a foi realizada a PCR convencional utilizando os iniciadores MC1 (5'-GTTAGCCGATGGTGGTCTTG-3') e MC2 (5'-CACCCATTTTCCGATTTTG-3'), conforme a metodologia descrita por Cortes *et al.* (2004).

A reação de PCR ocorreu em termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific®, United States) sob as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação de 95 °C por 5 minutos; uma sequência de 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos e 72 °C por um minuto; e um ciclo de final de 72 °C por 10 minutos. A eletroforese foi realizada em cuba específica (Bio-rad®, United States) à 140V por cinco minutos, seguido de 45 minutos a 110V. Para a leitura, 10µL de cada amostra foi homogeneizada junto a 2,5µL de azul de bromofenol a 0,25% e aplicada em gel de agarose a 1,5% (Agarose LE, Uniscience®, Brasil) contendo 3,8µL de brometo de etídio. Após esse processo, procedeu-se com a visualização em transiluminador de luz UV (Figura 1).

FIGURA 1. Reação em Cadeia pela Polimerase para *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* em amostras biológicas provenientes de animais domésticos do município de Araguaína-TO. Observar: 1- marcador de peso molecular de 100pb; 2- Controle positivo, Cepa P75; 3- animal positivo; 4- animal positivo; 5- animal positivo; 6- Biópsia de fígado de paciente canino (Meg); 7- animal negativo; 8- animal negativo; 9- animal negativo; 10- animal negativo; 11- animal negativo; 12- animal negativo; 13- poço sem amostra; 14- Controle negativo. Verificar a positividade das amostras dos poços 2 à 6 pela distribuição das bandas a uma altura de 447pb.

Fonte: Arquivo pessoal dos autores (2021).

DISCUSSÃO

Não é raro encontrar animais com quadro de artrite causada por leishmaniose visceral em cães, e tal quadro clínico se deve a presença direta do agente na articulação que causa reação inflamatória local ou a deposição de imunocomplexos (GIZZARELLO *et al.*, 2020). A utilização da artrocentese seguida do exame citológico do líquido sinovial é uma opção para o diagnóstico parasitológico em animais que vieram a óbito, e, quando aplicada em animais vivos, a coleta deve ser feita sempre com o animal sob anestesia geral ou sedação (CHAVES *et al.*, 2015). Em cães com leishmaniose confirmada laboratorialmente, a presença de formas amastigotas no líquido sinovial pode chegar a 87,5% (SILVA *et al.*, 2014). Rennó *et al.* (2019), no entanto, ressaltam que a sensibilidade é melhor em animais no estágio três da doença, ou seja, em animais com quadros graves. Outras espécies de *Leishmania* spp., como a *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* também acarretam quadros clínicos com apresentação de poliartrite (HOFFMANN *et al.*, 2012).

A presença de anemia e trombocitopenia corroborou ao encontrado por Braz *et al.* (2015). A anemia normocrômica também é comum em quadros de LVC, contudo a hipocromia pode ser atribuída aos distúrbios pró-inflamatórios na leishmaniose visceral ativa que levam a alterações no perfil de citocinas acarretando armazenamento de ferro mediado por hepcidina em macrófagos, reduzindo sua disponibilidade para eritropoiese (SINGH *et al.*, 2019). A trombocitopenia também é um achado comum na leishmaniose canina e pode decorrer por distúrbios na trombocitopoese, aumento por consumo ou por mecanismos trombocitopênicos imunomediados (DOMINGUEZ; TORAÑO, 2001). A elevação da ureia sérica pode ser decorrente de comprometimento renal (EBERT *et al.*, 2021). As lesões renais tubulares e intersticiais e específicas da doença são relacionadas à deposição por imunocomplexos ou mecanismos imunocelulares decorrente da infecção por *Leishmania* spp. (SALGADO-FILHO *et al.*, 2003).

O diagnóstico parasitológico possui alta especificidade, contudo pode ocorrer variação na sensibilidade (30-85%), pois os parasitos não se encontram homogeneamente distribuídos nos tecidos do animal parasitado (LAURENTI *et al.*, 2009; BRAZ *et al.*, 2014). Em cães, com ou sem histórico clínico de leishmaniose, no município de Araguaína, já se observou prevalência de 40,7% utilizando o diagnóstico parasitológico por punção de linfonodos periféricos (SANTOS *et al.*, 2017). Portanto, ainda que tenha uma limitação de sensibilidade, constitui ferramenta prática no diagnóstico laboratorial.

O isolamento permite caracterizar a espécie de *Leishmania* spp. que acometeu o animal, além de possibilitar o desenvolvimento de testes sorológicos com antígenos de cepas circulantes na região, o que pode aumentar a sensibilidade no desenvolvimento de testes sorológicos com antígeno bruto do isolado, e, quando associado à antígenos recombinantes pode aperfeiçoar o teste (ROSÁRIO *et al.*, 2005). Contudo, além da maior necessidade de infraestrutura, ainda há a desvantagem das contaminações, durante a coleta, após a inoculação no meio de cultura, ou até mesmo posteriormente ao isolamento ocasionada principalmente por contaminação fúngica ou bacteriana.

O diagnóstico molecular é útil para determinação da espécie de *Leishmania* spp, mas também para o estudo filogenético do parasito. Fernandes *et al.* (2019) indica maior capacidade do *primer* (13A/13B) desenvolvido por Rodgers *et al.* (1990) em detectar de espécimes caninos positivos no início da doença em comparação com outros iniciadores. O diagnóstico molecular é promissor, contudo, há necessidade de uma padronização a nível internacional ou nacional, além da utilização de equipamentos especializados limita a sua aplicação. No entanto, com o advento de processos que reduzam os insumos e equipamentos a tendência é que se empreguem cada vez mais as técnicas moleculares no diagnóstico clínico-veterinário e na rotina laboratorial.

CONCLUSÃO

Leishmania (Leishmania) infantum chagasi pode acarretar quadros clínicos de poliartrite em cães no município de Araguaína. Existe, portanto, a possibilidade da utilização do isolamento, do diagnóstico parasitológico e molecular em quadros clínicos compatíveis com leishmaniose visceral canina com bons resultados, demonstrando, deste modo, alternativas para o estudo filogenético do parasito e auxílio no fechamento do diagnóstico médico-veterinário.

AGRADECIMENTO

Ao apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Tocantins e ao Programa Pesquisa para o SUS – PPSUS do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)"

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, C.M.C.; COSTA, A.S.; RISSO, J.M.R. uso da miltefosina como terapia combinada em leishmaniose visceral canina-relato e caso. **Enciclopédia Biosfera**, v.15, n.27, p.106-116, 2018. Disponível em:<<https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/595>>. doi: 10.18677/EnciBio_2018A79

BEJANO, S.; SHUMIE, G.; KUMAR, A.; ASEMAHAGN, E.; DAMTE, D.; WOLDIE, S.; MULUGETA, A.; MANAYE, N.; GENETU, A.; GADISA, E.; MAMO, G. Prevalence of asymptomatic visceral leishmaniasis in human and dog, Benishangul Gumuz

regional state, Western Ethiopia. **Parasites & Vectors**, v.14, p.39, 2021. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04542-z>>. doi: 10.1186/s13071-020-04542-z

BRAZ, P.H.; LIMA, M.A.M.; MAIA, J.S.; ZANETTI, K.; REGINALDO, A.S.; BRAZ, P.H. Comparação da sensibilidade do teste parasitológico em linfonodo, medula óssea e mucosa conjuntival para o diagnóstico de leishmaniose em cães. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n.4, p.274-276, 2014. Disponível em: <<https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/5200>>. doi: 10.21708/avb.2014.8.4.5200

BRAZ, P.H.; SARTORETTO, M.C.; SOUZA, A.S.; MELO, F.M.G. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.9, n.1, p.87-90, 2015. Disponível em: <<https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/5273>>. doi: 10.21708/avb.2015.9.1.5273

CHAVES, R.O.; BECKMANN, D.V.; COPAT, B.; BAUMHARDT, R.; ANDRADES, A.O.; SILVEIRA, L.B.; SILVA, A.P.; MAZZANTI, A. Polyarthritis in dogs – 27 cases (2007-2013). **Ciência Rural**, v.45, n.3, p.533-539, 2015. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cr/a/dRCgBNN7DD6XfSTf4bHtpxg/?format=pdf&lang=pt>>. doi: 10.1590/0103-8478cr20131101

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.98, n.1, p.12-17, 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/98/1/12/1900966?redirectedFrom=fulltext>>. doi: 10.1016/S0035-9203(03)00002-6

COSTA, D.N.C.C.; CODEÇO, C.T.; BERMUDI, P.M.M.; RODAS, L.A.C.; NUNES, C.M.; HIRAMOTO, R.H.; TOLEZANO, J.E.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. matemática Control of canine visceral leishmaniasis by euthanasia: estimated effect based on a survey and mathematical modeling. **Cadernos de Saúde Pública**, v.36, n.2, p.e00221418, 2020. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/csp/a/bcBmtWnBvLvjp6NFgBvpxtg/?lang=pt&format=pdf>>. doi: 10.1590/0102-311X00221418

DOMINGUEZ, M.; TORAÑO, A. *Leishmania* immune adherence reaction in vertebrates. **Parasite Immunology**, v.23, n.5, p.259-265, 2001. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-3024.2001.00380.x?sid=nlm%3Apubmed>>. doi: 10.1046/j.1365-3024.2001.00380.x

EBERT, K.G.; MOTTA, L.M.; ROSA-JÚNIOR, F.H.; CARDOSO, E.; BATISTA, K.Z.S. Registro de primeiro caso de leishmaniose visceral canina (alóctone) em Indaial – SC: Relato de caso. **Pubvet**, v.15, n.1, p.1-6, 2021. Disponível em: <<https://www.pubvet.com.br/uploads/eb38303b416be8f83b4049fc0f12e21b.pdf>>. doi: 10.31533/pubvet.v15n01a728.1-6

FERNANDES, M.A.; LEONEL, J.A.F.; ISAAC, J.A.; BENASSI, J.C.; SILVA, D.T.; SPADA, J.C.P.; PEREIRA, N.W.B.; FERREIRA, H.L.; KEID, L.B.; SOARES, R.M.; OLIVEIRA, T.M.F.S. Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA according to clinical stages of leishmaniasis in dog. **Revista Brasileira de Parasitologia**

Veterinária, v.28, n.2, p.194-202, 2019. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbpv/a/fp5jJyWyYgwN33tcZwkMhWy/?lang=en>>.doi:10.1590/S1984-29612019015

GALUZZI, L.; CECCARELLI, M.; DIOTALLEVI, A.; MENOTTA, M.; MAGNANI, M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v.11, p.273, 2018. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-2859-8>>. doi: 10.1186/s13071-018-2859-8

GALVIS-OVALLOS, F.; CASANOVA, C.; PIMENTEL BERGAMASCHI, D.; BIANCHI GALATI, E.A. A field study of the survival and dispersal pattern of *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.12, n.4, p.e0006333, 2018. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006333>>. doi: 10.1371/journal.pntd.0006333

GIZZARELLO, M.; FIORENTINO, E.; FAYALA, N.E.H.B.; MONTAGNARO, S.; TORRAS, R.; GRADONI, L.; OLIVA, G.; MANZILLO, V.F. Assessment of circulating immune complexes during natural and experimental canine leishmaniasis. **Frontiers in Veterinary Science**, v.7, p.273, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2020.00273/full>>. doi: 10.3389/fvets.2020.00273

HOFFMANN, A.R.; NAVARRO, I.T.; CAMARGO-JUNIOR, V.E.; CALDART, E.T.; BREGANÓ, R.M.; PEREIRA, P.M. *Leishmania amazonensis* em cão com quadro clínico de leishmaniose visceral no Estado do Paraná, Brasil – relato de caso. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.2, p.3265-3270, 2012. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/11044>>. doi: 10.5433/1679-0359.2012v33n6Supl2p3265

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.6, n.1, p.13-23, 2009. Disponível em: <<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/bepa/v6n67/v6n67a02.pdf>>.

RENNÓ, M.C.; VASCONCELLOS, A.O.; SANTOS, R.R.; SILVA, R.O.S.; CARNEIRO, R.A.; PAES, P.R.O. Synovial fluid as an auxiliary diagnostic tool for different stages of canine visceral leishmaniasis. **Ciência Rural**, v.49, n.5, p.e20190023, 2019. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cr/a/3HJBBF9H68KJtbx88YhYhxK/?lang=en>>. doi: 10.1590/0103-8478cr20190023

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v.71, n.3, p.267-275, 1990. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0014489490900317?via%3Dihub>>. doi: 10.1016/0014-4894(90)90031-7

ROSÁRIO, E.Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; MAYRINK, W.; REIS, A.B. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine

visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.2, p.197-203, 2005. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/mioc/a/sSj9wNpGJzVCXwBtXCLSJGK/?lang=en>>. doi: 10.1590/S0074-02762005000200015

SALGADO-FILHO, N.; FERREIRA, T.M.A.F.; COSTA, J.M.L. Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.2, p.217-221, 2003. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/SHGCCzmWKcVfB53DHXPBGyf/abstract/?lang=pt>>. doi: 10.1590/S0037-86822003000200004

SANTOS, H.D.; GALVÃO, S.R.; DIAS, F.E.F.; RIBEIRO, T.M.P.; NEGREIROS-FILHO, O.; SOUSA, S.A.P.; MINHARRO, S. High frequency of visceral leishmaniasis in dogs under veterinary clinical care in an intense transmission area in the state of Tocantins, Brazil. **Ciência Rural**, v.47, n.3, p.e20160260, 2017. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/cr/a/rtGkK74Yd5wqLkkBmFGcwj/?lang=en>>. doi: 10.1590/0103-8478cr20160260

SANTOS, R.C.; PINHO, F.A.; PASSOS, G.P.; LARANJEIRA, D.F.; BARROUIN-MELO, S.M. Isolation of naturally infecting *Leishmania infantum* from canine samples in Novy-MacNeal-Nicolle medium prepared with defibrinated blood from different animal species. **Veterinary Parasitology**, v.15, n.157, p.10-14, 2018. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304401718301924?via%3Dihub>>. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.05.010

SILVA, M.N.G.; PEREIRA, D.T.P.; MISTIERI, M.L.A.; LUBECK, I.; PASCON, J.P.E. Parasitological analysis of synovial fluid from dogs naturally infected with *Leishmania* sp. **Ciência Rural**, v.44, n.7, p. 1236-1239, 2014. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cr/a/CNkTWWZjC55N9tg73QWcVbB/?lang=en>>. doi: 10.1590/0103-8478cr20130965

SILVA, R.B.S.; MENDES, R.S.; SANTANA, V.L.; SOUZA, H.C.; RAMOS, C.P.S.; SOUZA, A.L.; ANDRADE, P.P.; MELO, M.A. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.7, p. 625-629, 2016. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/pvb/a/jgKmMn6T5YfKDLXswwvpRJg/?format=pdf&lang=pt>>. doi: 10.1590/S0100-736X2016000700011

SILVEIRA, N.S.D.; MENDES, E.M.; PEREIRA, M.L.; TAVELA, A.O.; VEIGA, A.P.M.; ZIMERMANN, F.C. Visceral leishmaniasis in dogs. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.49 (supl 1), p. 610, 2021. Disponível em: < <https://seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/106853>>. doi: 10.22456/1679-9216.106853

SINGH, B.; SINGH, S.S.; SUNDAR, S. Hepcidin mediated iron homeostasis as immune regulator in visceral leishmaniasis patients. **Parasite Immunology**, v.41, n.1, p.12601, 2019. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pim.12601>>. doi: 10.1111/pim.12601

SIRIPATTANAPIPONG, S.; BOONTANOM, P.; LEELAYOOVA, S.; MUNGTHIN, M.; TAN-ARIYA, P. In vitro growth characteristics and morphological differentiation

of *Leishmania martiniquensis* promastigotes in different culture media. **Acta Tropica**, v.197, p. 105039, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X19305662?via%3Dihub>>. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.05.030

TRAVI, B.L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRO, G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n.1, p.e0006082, 2018. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006082>>. doi: 10.1371/journal.pntd.0006082

ZIEMNICZAK, H.M.; SILVA, G.H.L.; MAIA, M.P.; FERREIRA, E.; SATURNINO, K.C. SANTOS-DONI, T.B. Canine visceral leishmaniasis in Rondônia, Brazil: a report of an autochthonous case. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.15, n.1, p.15-18, 2021. Disponível em: <<https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/9422>>. doi: 10.21708/avb.2021.15.1.9422