



Centro Universitário de Brasília – CEUB
Faculdade de Ciências da Educação e Saúde

KÁLYDA SANTANA

**Avaliação sorológica de cães vacinados contra
leishmaniose visceral no Canil da Polícia Federal de
Brasília**

BRASÍLIA

2021

KÁLYDA SANTANA

**Avaliação sorológica de cães vacinados contra
leishmaniose visceral canina no Canil da Polícia
Federal de Brasília**

Artigo apresentado para a obtenção
do grau em bacharel em Medicina
Veterinária – Faculdade de Ciências
da Educação e Saúde.
Orientador: Prof. Lucas Edel Donato.

BRASÍLIA

2021

KÁLYDA SANTANA

**Avaliação sorológica de cães vacinados contra
leishmaniose visceral no Canil da Polícia Federal de
Brasília**

Artigo apresentado para a obtenção
do grau em bacharel em Medicina
Veterinária – Faculdade de Ciências
da Educação e Saúde.

Brasília, 03 de dezembro de 2021.

Banca examinadora

Prof. Dr. Lucal Edel Donato
Orientador
Centro Universitário de Brasília

Prof. Dra. Rafaela Albuquerque e Silva
Centro Universitário de Brasília

Camila Santana
Ministério da Saúde

Avaliação sorológica de cães vacinados contra leishmaniose visceral no Canil da Polícia Federal de Brasília

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma grave e negligenciada doença causada por parasitas protozoários do gênero *Leishmania* e tem sido relatada em várias áreas ao redor do mundo, incluindo a América do Sul e o Sul da Europa. O estudo teve como objetivo principal processar amostras biológicas de cães residentes de área endêmica para leishmaniose visceral utilizando técnicas imunológicas TR-DPP® Biomanguinhos/Fiocruz e moleculares (qPCR). Na pesquisa foi realizado exame físico de todos os 19 animais que representavam as amostras de soro doados pelo canil de vacinados contra LVC. Nenhum dos animais apresentou qualquer sinal clínico relacionado à doença. O teste sorológico 15,79% (03) das amostras apresentaram um resultado visual positivo e 84,21% (16) apresentaram o resultado visual negativo. Os animais que testaram positivos no teste sorológico foram submetidos ao teste molecular qPCR como apoio ao diagnóstico, através de amostras retiradas pela punção de medula óssea e as três amostras testadas apresentaram resultado negativo para *Leishmania infantum* (*Chagasi*). O trabalho demonstrou que existem grandes desafios no que tange o diagnóstico de LVC, portanto mais pesquisas relacionadas ao tema devem sempre ser incentivadas de forma abrangente afim de gerar informações, sobre falhas e sucessos nas estratégias adotadas no diagnóstico.

Palavras chaves: Leishmaniose; Diagnóstico LVC; qPCR Leishmaniose; TR-DPP®

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma grave e negligenciada doença causada por parasitas protozoários do gênero *Leishmania* e tem sido relatada em várias áreas ao redor do mundo, incluindo à América do Sul e o Sul da Europa (ALVAR et al, 2012; FIGUEIREDO et al, 2018). O número de indivíduos infectados no Brasil é o maior da América Latina, concentrando 90% dos casos notificados (OPAS-WHO 2020). O perfil dos casos das doenças em seres humanos normalmente se enquadra em pessoas de baixa renda e que residem em áreas rurais ou periurbanas (BRASIL, 2014).

No ciclo biológico da LV, os cães domésticos são considerados reservatórios e, uma vez infectados, podem abrigar em sua derme uma alta carga de células do sistema imune infectadas pela forma amastigota do parasito (RIBEIRO et al. 2019). O controle do reservatório canino é realizado por meios do inquérito sorológico e aplicação de colares com inseticida. A eutanásia dos animais infectados também se configura como uma das estratégias de controle atualmente utilizadas e é amplamente discutida pela sociedade civil e acadêmica (GRISOTTI e AMORIM, 2020).

O diagnóstico de leishmaniose em cães é desafiador e depende de várias etapas para que seja confiável. Critérios epidemiológicos, áreas endêmicas ou não, observação e sinais clínicos sugestivos como hepatomegalia, linfadenomegalia, onicogrifose, além dos exames laboratoriais (OPAS-WHO 2020). Diversos testes auxiliam no diagnóstico da doença, como por exemplo os métodos parasitológicos que permitem a visualização do parasito através da biópsia de pele ou aspirado de linfonodos e medula óssea onde é possível visualizar a forma amastigota do parasito. Os diagnósticos sorológicos atualmente aplicadas pelo Ministério da Saúde para testagem de cães são imunofluorescência indireta (RIFI) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Os testes trazem praticidade para a rotina clínica e de pesquisas além de apresentar boa sensibilidade e especificidade (BRASIL, 2014).

O estudo teve como objetivo principal processar amostras biológicas de cães residentes de área endêmica para leishmaniose visceral utilizando técnicas imunológicas e moleculares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho do estudo

Tratou-se de um estudo transversal onde foram usadas 19 amostras de soro de cães vacinados contra Leishmaniose Visceral Canina (LVC), doadas pelo canil da Polícia Federal de Brasília. Os animais são cães da raça Pastor Alemão e Pastor de Malinois, raças com alto potencial zootécnico e genético.

O manejo reprodutivo, o protocolo de vacinação e a vermifugação são realizados na sua integralidade dentro da instituição. É realizada a aplicação de todas as vacinas essenciais, pelas marcas Vanguard® HTPL 5/CV-L contra cinomose, adenovírus tipo-2, coronavírus, parainfluenza, parvovirose, *leptospira icterohaemorrhagiae* e *leptospira canicola*; a vacina Defensor® contra o vírus da raiva; a vacina BronchiGuard® contra Tosse dos Canis (*Bordetella bronchiseptica*) e a vacina Lesh-Tec® contra a Leishmaniose. Sendo as duas últimas indicadas para a região.

Estes cães apresentam uma rotina de simulações de treinamento e missões dentro do Distrito Federal ou em outras Unidades Federativas. A instalação do canil está localizada no endereço SAIS, Quadra 7, Lote 23, s/n, Estr. St. Policial Militar/Sul, área endêmica para leishmaniose visceral canina.

Exame físico

Foi realizado o exame físico dos animais, observando se os parâmetros clínicos estão dentro da normalidade. O exame consistia na verificação da temperatura retal (TR); pressão sistólica (PAS); pressão diastólica (PAD); pressão média (PAM); padrão das mucosas; tempo de preenchimento capilar (TPC); palpação dos linfonodos; pulso femoral; palpação abdominal; inspeção dos membros; inspeção da pele e anexos; auscultação cardíaca; débito cardíaco (DC) e auscultação pulmonar.

Teste sorológico

Foi realizada a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* no soro usando a técnica do teste imunocromatográfico rápido - Dual Path Platform (TR-DPP® CVL, Rio de Janeiro, RJ, BR), realizado de acordo com as instruções do

fabricante (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ). Todas as amostras foram totalmente descongeladas e homogeneizadas vigorosamente antes do teste. Foi utilizado um volume aproximado de 5 µL de sangue ou soro sem anticoagulante para a realização dos testes. O resultado foi considerado positivo quando as duas faixas, uma faixa referente à amostra e uma do controle do teste, estavam visíveis.

Teste molecular para LVC

As amostras de medula óssea dos animais que testaram positivo no teste sorológico TR-DPP®, foram coletadas de acordo com os protocolos internos do canil e os resultados o exame do PCR real time foi doado para essa pesquisa.

A técnica realizada foi uma PCR quantitativa em tempo real (qPCR) baseada na amplificação do DNA do mini-círculo do cinetoplasto de *L. infantum* (kDNA). Para isso foi empregado o conjunto LINF 1B, conforme protocolo padronizado por Paiva-Cavalcanti et al. (2009). Os primers detectam um fragmento de 132 pares de bases (pb) do kDNA do Complexo *L. donovani*. Para quantificação da carga parasitária, foi preparada uma curva padrão obtida do DNA de referência de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) (MHOM/BR/1974/ PP75). Todas as amostras foram testadas em duplicata e o programa de PCR foi executado durante 40 ciclos. Um controle sem molde (NTC) foi adicionado em duplicata em todas as reações. Como critério de positividade do ensaio de qPCR, a curva de amplificação deveria ultrapassar o limiar antes do ciclo 36, conforme estabelecido por Trajano-Silva et al. (2017).

RESULTADOS

Exame físico

Na anamnese dos animais, os resultados foram homogêneos e sem grandes variações. Todos os animais demonstraram bom estado geral e não houve registros de alterações de apetite ou sinal de dor. Não foram registrados animais com alterações na pele ou oculares, onde todos apresentavam aspectos

normais. Nenhum sinal neurológico anormal foi observado nos animais. Anormalidades gastrointestinais não foram registradas na anamnese, bem como não foram registrados sinais deletérios nos sistemas renal e cardíaco. A auscultação pulmonar de todos os animais não apresentou padrões de anormalidade. Durante a palpação abdominal não foi registrado sinal de dor ou órgãos aumentados. Todos os animais apresentaram linfonodos não reativos. Os parâmetros físicos registrados com o oscilômetro PAS, PAD e PAM seguiram sempre dentro da faixa de normalidade para a espécie. O TPC sempre dentro de 2 segundos. A TR sempre entre 37,8°C a 39°C graus. O DC de todos os animais ficou dentro do padrão normal para a espécie, na faixa de 120 a 160 bpm. As mucosas sempre róseas, sem variações registradas. E pulso femoral de todos animais foram registrados como forte e pulsante. Os exames físicos não apresentaram nenhum sinal clínico da LVC nos cães desse estudo.

Teste sorológico

Os testes sorológicos Dual Path Platform (TR-DPP® CVL, Rio de Janeiro, RJ, BR), foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ). Das dezenove amostras doadas pelo canil 15,79% apresentaram um resultado visual positivo (Figura 1) e 84,21% apresentaram o resultado visual negativo, conforme exemplifica a tabela 1.

Teste molecular

Os animais que testaram positivos no teste TR-DPP® CVL foram incluídos na etapa de teste confirmatório para LVC através da técnica qPCR real time, pelo laboratório Tecnologia em Sanidade Animal (TECSA). As amostras enviadas foram coletadas pelo veterinário através da punção de medula óssea. Todas as três amostras testadas apresentaram resultado negativo para *Leishmania infantum* (*Chagasi*), conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 1. Resultado dos testes Dual Path Platform (TR-DPP® CVL) realizados no canil da Polícia Federal de Brasília.

% de animais reagentes e não reagentes para LVC testados pelo DPP® CVL			
Condição clínica	Nº de animais	Positivo (%)	Negativo (%)
Assintomáticos	19	15.79	84.21

Figura 1 – Teste DPP-positivo realizado com amostra de soro dos cães da polícia federal de Brasília



Fonte: Santana, 2021.

Tabela 2. Resultado do exame molecular realizado (qPCR) nas amostras de medula óssea do canil da Polícia Federal de Brasília com animais reagentes no teste sorológico TR-DPP® CVL, pelo laboratório TECSA.

% de animais negativos ou positivos para LVC testados pela técnica qPCR			
Condição clínica	Nº de animais	Negativo (%)	Positivo (%)
Assintomáticos	03	100	0

DISCUSSÃO

As diferentes respostas imunológicas que o animal infectado pelo protozoário *Leishmania* pode apresentar, contribui para resistência ou exacerbação dos sinais clínicos que se manifestam de forma aguda, subaguda, crônica e regressiva segundo relata o autor Teixeira et al (2019). Após a infecção os sinais clínicos podem variar de diversas formas, entretanto o mais comum é o surgimento de lesões cutâneas, em sua maioria sendo relatadas como dermatite esfoliativa nas regiões de orelha e membros, e a dermatite ulcerativa,

principalmente em região do focinho segundo o autor Santos et al (2021) que complementa as informações de sinais clínicos como a perda de peso, poliúria e vômitos e a onicogrifose, sendo descritas como a manifestação mais comum e mais relatada em cães positivos para LVC. Nesse estudo os cães participantes não apresentaram nenhum sinal clínico da doença.

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, as medidas para mitigação da leishmaniose visceral envolvem o diagnóstico precoce e o tratamento de casos humanos; redução da população de vetores por meio da pulverização de inseticidas residuais em domicílios; levantamentos sorológicos de cães; eutanásia de animais soropositivos e educação em saúde (BRASIL, 2006). Uma vez infectado, o cão será portador da doença por toda a vida, pois não existe cura para LVC. O tratamento não é configurado como medida de saúde pública, sendo uma decisão exclusiva do tutor. (MAPA, 2008).

Segundo relatou a pesquisa de Pessoa-e-Silva (2019), além de possuir um tratamento desafiador, a LV traz desafios por ter cães participando do seu ciclo biológico, onde a redução dos cães reservatórios é difícil e complicada. Os autores Borja et al (2016) e Travi et al (2018) relacionam esse fato a alta carga parasitária da forma amastigota do protozoário na pele do cão, que acaba favorecendo a infecção do vetor flebotomíneo que irá possivelmente infectar outros cães ou humanos no momento do repasto sanguíneo.

Nesse cenário Silva et al (2018) relatou um estudo realizado no estado de Fortaleza, na cidade de Montes Claros, local com intensa transmissão de leishmaniose visceral, onde flebotomíneos foram capturados ao longo de 30 meses por quatro bairros e cães também utilizaram coleiras impregnada com 4% de deltametrina (Scalibor®) como forma de prevenção para LVC afim de afastar o vetor e quebrar o ciclo biológico da doença. Os resultados apresentaram que quando os cães utilizavam a coleira houve uma menor abundância da população vetorial comparando com áreas onde houveram intervenção e onde não houveram intervenção. O autor Leite et al (2018) também relatou o estudo com coleiras impregnada de 4% de deltametrina em duas áreas endêmicas do distrito de Monte Gordo (Bahia-Brasil), onde a pesquisa analisou os animais reservatórios (cães) com testagem negativa para LVC usando a coleira de inseticida, e uma área de controle na qual foram aplicadas apenas medidas convencionais de controle de LVC. Apesar de Silva et al (2018) e Leite

et al (2018) terem analisados diferentes intervenções no ciclo biológico, vetores e reservatórios respectivamente, eles analisaram também a associação uso da coleira inseticida e os resultados de ambos, apesar de inconclusivos, sugerem que a medida de controle provavelmente fornece proteção ao longo do tempo. Os autores ressaltam que nas áreas endêmicas do Brasil, essa estratégia traz muitos desafios e ajustes seriam necessários, incluindo melhor desenho da coleira. Nesse presente estudo observou-se que os animais do canil não utilizavam a coleira impregnada com inseticida como recomendam as diretrizes de controle da doença, mas segundo relatado pelo veterinário responsável as coleiras se rompem com facilidade durante a rotina de exercícios dos animais tornando inviável a reposição contínua pelo seu alto custo.

No cenário de medidas de controle da LVC, o diagnóstico continua sendo uma importante ferramenta para mitigação da doença. Diversos estudos são discutidos pela comunidade acadêmica e de forma geral sempre são relatadas falhas no processo de diagnósticos padronizados, sendo a única concordância de todos que um segundo teste confirmatório deve ser realizado sempre (BANETH e AROCH 2008; ALVES et al, 2012; FIGUEIREDO et al, 2018; RIBEIRO et al, 2019).

Segundo Brasil (2006), as técnicas recomendadas pelo Ministério da Saúde são RIFI e ELISA. No presente estudo as amostras não puderam ser testadas pelas técnicas ELISA e RIFI. Os testes sorológicos se baseiam na resposta humoral específica. Os cães sintomáticos desenvolvem boa resposta humoral, sendo que o aumento dos títulos de anticorpos ocorre ao longo do tempo. Porém, nas fases inicial e tardia da doença e em cães assintomáticos, a produção de anticorpos é baixa o que pode resultar em falsos-negativos. Segundo Solano-Gallego et al (2019) além da testagem por sorologia, pode-se realizar a identificação microscópica da *L. chagasi* em aspirados de baço, medula óssea, linfonodos e esfregaço sanguíneo. Outro meio de diagnóstico é através da reação em cadeia de polimerase (PCR) dos mesmos tecidos utilizados para o aspirado.

Conforme os autores Galluzzi et al (2018) e Silva et al (2020) definiram em suas pesquisas, um diagnóstico correto é fundamental para aplicar o tratamento adequado e o uso de técnicas moleculares no diagnóstico da leishmaniose tem se tornado cada vez mais relevante devido à sua notável sensibilidade,

especificidade e possível aplicação em uma variedade de amostras clínicas. Galluzzi et al (2018) descreve que entre as abordagens relatadas como apoio ao diagnóstico as abordagens baseadas em PCR em tempo real (qPCR) têm se tornado mais populares nos últimos anos. No entanto, apesar dos métodos baseados em qPCR terem se mostrado muito eficazes no diagnóstico da leishmaniose, não existe um método padronizado.

Os trabalhos pioneiros de Bretagne et al. (2001) e Nicolas et al. (2002) descreveram dois métodos baseados em qPCR para detectar e quantificar parasitas de *Leishmania* usando o gene da DNA polimerase e o DNA do cinetoplasto de minicírculos (kDNA) como alvo, respectivamente. Desde então, uma variedade de ensaios baseados em qPCR foram desenvolvidos em diferentes alvos moleculares, não apenas para detecção e quantificação de espécies de *Leishmania*, mas também para genotipagem e identificação de espécies. Segundo Galluzzi et al (2019) a sensibilidade e especificidade relatadas para os ensaios qPCR publicados são variáveis. Por exemplo, os ensaios qPCR desenvolvidos para o diagnóstico de LV em humanos mostraram sensibilidade entre 91,3-100%, indicando a utilidade do qPCR quando uma ferramenta sensível é fundamental.

Não existe consenso em relação aos procedimentos de coleta de amostra clínica para extração do DNA. Para métodos de extração de DNA são utilizadas técnicas como aspiração de medula óssea ou linfonodos, biopsia de fígado ou baço (PESSOA-E-SILVA et al, 2019; RIBEIRO et al 2019; SOLANO-GALLENO et al, 2019). Galluzzi et al (2019) descreve que além falta de padronização para coleta à heterogeneidade de ensaios baseados em qPCR publicados e também ao fato de que cada um ensaio possui prós e contras, uma abordagem ideal é de difícil definição. Apesar dos consideráveis avanços obtidos nos últimos anos, a PCR em tempo real ainda está longe da aplicação de rotina clínica em áreas endêmicas. Um consenso entre as pesquisas sobre a utilização de testes moleculares para o diagnóstico da doença é que o custo com equipamentos e reagentes é um fator que dificulta a transição da pesquisa para a aplicação clínica de rotina em áreas endêmicas (PESSOA-E-SILVA et al, 2019; RIBEIRO et al 2019; SOLANO-GALLENO et al, 2019; GALUZZI et al, 2019). No presente estudo os animais do canil que testaram positivo para o LVC no TR-DPP

Biomanguinhos/FioCruz, foram submetidos à punção de medula óssea sob anestesia.

Neste presente estudo a especificidade e a sensibilidade dos resultados dos testes não foram calculadas pois os critérios para definição do padrão-ouro não puderam ser estabelecidos com precisão.

CONCLUSÃO

O trabalho demonstrou que existem grandes desafios relacionados com o diagnóstico de LVC, portanto mais pesquisas relacionadas ao tema devem sempre ser incentivadas de forma abrangente afim de gerar informações, sobre falhas e sucessos nas estratégias adotadas no diagnóstico e controle da doença.

Agradecimentos

Aos meus pais Sonia e Guilherme e minhas irmãs, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho e também por todo apoio durante o processo desta graduação, minha gratidão é eterna.

Ao meu companheiro desta e de outras vidas René, pelo apoio incondicional durante todos os anos desde que ingressei nessa missão na veterinária. A jornada teria sido muito penosa sem o seu amor, sou imensamente grata pelo seu apoio.

Aos amigos e parceiros de jornada Carol, Carolzinha, Gabriel, Leonardo e Guthierry, agradeço pela amizade sincera, pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período dedicado à nossa formação. Nosso grupo trazia leveza para os dias pesados, sem vocês eu não teria sorrido tanto ao longo desses anos, gratidão.

Ao meu querido professor e orientador Lucas o qual tenho profunda admiração. Agradeço seu apoio contínuo à minha formação, sua paciência, motivação e conhecimento. O respeito e carinho que sempre tratou a mim e a todos seus alunos serão sempre fonte de inspiração na minha vida.

Aos professores Cristiano, Rafaela, Luciana, Bruno, Camila, Daniela, Chico, Andrei, Mirna, Ranieri, Emanuel, Lorena, Franscilete, Fabrício, Caic e ao coordenador Carlos, com quem tive o prazer de conviver e aprender, preciso dizer que vocês me inspiraram e desafiaram constantemente, transformando minha forma de pensar, de ser, de agir e de comunicar. Não sou mais a mesma depois que eles passaram pela minha vida e serei eternamente grata por isso.

Agradeço à vida de todos os animais que tive contato durante a minha formação. Todos eles me proporcionaram uma oportunidade de aprendizado e por consequência agregando conhecimento, não existe palavras para todo amor que recebi desses seres, serei sempre grata.

Agradeço ao meu filho Ravi pela sua vida. Nada faz sentido sem o seu amor.

Ao meu cavalo Conde, dedico esse trabalho. Sem a sua passagem pela minha vida, eu jamais teria chegado até aqui.

Referências

- ALVAR, J. et al. Leishmaniose Estimativas Mundiais e Globais de Sua Incidência. **PLoS ONE**. v. 7, ed. 5, p. 1-12, mai. 2012.
- ALVES, A.S. et al. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Research in Veterinary Science**. v. 93, p. 1329–13, 2012.
- BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. **The Veterinary Journal**. v. 175, ed. 1, p. 14-15, jan. 2008.
- BORJA, L. S. et al. 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**. v. 229, p.110-117, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1ª ed. Brasília, DF; 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. 5. reimpr. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014.
- BRETAGNE, S. et al. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. **Clin Vaccine Immunol**. v. 8, p. 828–31, 2001.
- FIGUEIREDO F. B. et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. vol. 113, n. 11, p. 1-7, 2018.
- GALLUZZI, L. et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites Vectors**. v. 11, n. 273, 2018.
- GRISOTTI M.; L. C. AMORIM. Entre o amor ao animal e a saúde pública: reflexões sociológicas sobre a leishmaniose visceral canina. **Estud. sociol. Araraquara**. v.25 n.49 p.121-146, jul-dez. 2020.
- LEITE, B. M. M. et al. The mass use of deltamethrin collars to control and prevent canine visceral leishmaniasis: A field effectiveness study in a highly endemic area. **PLOS Neglected Tropical Disease**. v. 12, n. 5, 1-9, 2018.
- NICOLAS et al. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. **J Clin Microbiol**. v. 40 p. 1666–1669. 2002.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. Nota Técnica, nº1.426 de 11 de julho de 2008. **Coordenação de fiscalização de produtos Veterinários-DFIP-SDA-CPV**. 2016. Disponível em: <https://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>.

- OPAS-WHO, Organização Pan-Americana da Saúde/World Health Organization. **Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas**. n. 9, dezembro de 2020. Washington: OPAS; 2020.
- PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 2, p. 356–358, 2009.
- PESSOA-E-SILVA, R. et al. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. **Experimental Parasitology**. v. 199, p. 9–16, 2019.
- RIBEIRO, V. M. et al. Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs. **Veterinary Parasitology**. v. 274, p. 1-6, 2019.
- SANTOS M. O. D. F, et al. Leishmaniose visceral canina: princípios do diagnóstico. **Brazilian Journal of Development**. v.7, n. 9, p. 92194-92200, set. 2021.
- SILVA, M. B. C. et al. Diagnóstico molecular qualitativo por PCR para detecção de *leishmania sp.* em cães. **A Transformação da Agronomia e o Perfil do Novo Profissional**. cap. 11. p. 94-107. 2020.
- SILVA, R. A. et al. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, vol. 113. n. 5. 2018
- SOLANO-GALLEGO et al., Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines. **Trends in Parasitology**. v. 33, n. 9, p. 706–717. 2017.
- TEIXEIRA, A. I. P. **Cães e tutores: os desafios do diagnóstico e do controle da leishmaniose visceral canina**. 2019. 178 f., il. Tese (Doutorado em Medicina Tropical). Universidade de Brasília, Brasília, 2019.
- TRAJANO-SILVA, L. A. M. et al. Standardization and evaluation of a duplex real-time quantitative PCR for the detection of *Leishmania infantum* DNA: a sample quality control approach. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. v. 50, n. 3, mai-jun. 2017.
- TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 12, n. 1, p. 1-13, 2018.