

<https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n08a886.1-7>

Diagnóstico imunológico e molecular da Leishmaniose Visceral Canina: Revisão

Leonardo Marchetti Motta¹ , Kaio Gutieres Ebert¹ , Keila Zaniboni Siqueira Batista^{2*} 

¹Acadêmico do curso de Medicina Veterinária da Universidade Regional de Blumenau – FURB.

²Docente do Departamento de Ciências Naturais da Universidade Regional de Blumenau – FURB.

*Autor para correspondência, E-mail: keila_siqueira@furb.br

Resumo. A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) possui alto potencial zoonótico e patológico, causando grande impacto no sistema imune dos cães acometidos. Para que uma suspeita de LVC seja confirmada, é necessário a realização de testes sorológicos e moleculares que possuam alta sensibilidade e sejam mais confiáveis. Os principais testes utilizados para o diagnóstico são o ELISA e RIFI, que, dentre os testes imunológicos, são os ensaios de maior sensibilidade e especificidade. O objetivo deste artigo foi revisar os principais testes imunológicos e moleculares para LVC, apontando as vantagens e desvantagens de cada ensaio, bem como sua utilidade na conclusão do diagnóstico e manejo do animal acometido.

Palavras-chave: Cães, imunodiagnóstico, parasitologia clínica, trypanossomatidae

Immunological and molecular diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis: Review

Abstract. Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) has a high zoonotic and pathological potential, causing a major impact on the immune system of affected dogs. For a suspected CVL to be confirmed, it is necessary to perform serological and molecular tests that have high sensitivity and are more reliable. The main tests used for the diagnosis are ELISA and IFAT tests, being those with higher sensitivity and specificity among immunological tests. The aim of this review was to describe the main immunological and molecular tests for CVL, pointing out the advantages and disadvantages of each assay, as well as their usefulness in concluding the diagnosis and management of the affected animal.

Keywords: Dogs, immunodiagnosis, clinical parasitology, Trypanosomatidae

Introdução

A Leishmaniose Visceral é uma doença de caráter crônico que acomete mamíferos domésticos, bem como animais de vida livre, como canídeos silvestres, marsupiais e xenartros. Entretanto, o cão é apontado como o principal hospedeiro reservatório da doença, tendo em vista que é um dos animais que apresenta maior proximidade com o ser humano, tornando possível a transmissão zoonótica (Megid et al., 2016; F. S. Silva, 2007). A enfermidade possui uma ampla distribuição geográfica, acometendo com maior frequência os países tropicais como os da América Central e África, além do Brasil (Bondan & Camargo, 2015). Trata-se de uma parasitose causada por um protozoário da família Trypanosomatidae, intracelular obrigatório que infecta macrófagos do hospedeiro, se reproduzindo em seu interior. Sua transmissão ocorre por um vetor invertebrado da espécie *Lutzomyia longipalpis*, comumente denominado de mosquito-palha, devido sua coloração (Faria & Andrade, 2012; Greene, 2006).

O agente etiológico da doença é o parasito do gênero *Leishmania*, que pode ser de diferentes espécies, como a *Leishmania donovani* que acomete o território indiano, a *Leishmania infantum*, prevalente nas

regiões do Mar Mediterrâneo, Europa, África e China e a *Leishmania chagasi* que acomete as Américas ([Schimming & Silva, 2012](#)).

Seu ciclo é heteroxeno, possuindo dois estágios de desenvolvimento, um no flebotômico e o outro no hospedeiro mamífero. O estágio de desenvolvimento no trato digestivo do mosquito são as promastigotas, cujo protozoário está com seu flagelo exposto, livre no estômago do vertebrado, se multiplicando por fissão binária. Quem transmite o protozoário é a fêmea do *L. longipalpis*, uma vez que necessita de nutrientes para o desenvolvimento dos ovos após cópula ([Monteiro et al., 2005](#)). No momento do repasto sanguíneo, as promastigotas são inoculadas na epiderme do cachorro, por regurgitação. Estas são fagocitadas por células da imunidade inata, em especial os macrófagos. Nessas células, o parasita retrai seu flagelo e diferencia-se em amastigotas, com novo processo de fissão binária. Devido a uma grande quantidade de parasitas, o macrófago se rompe liberando as amastigotas na corrente sanguínea, que serão fagocitadas por novos macrófagos, reiniciando o ciclo. Assim, o parasito se dissemina via hematogênica e linfática para outros tecidos, acometendo órgãos importantes como fígado, medula óssea, rins e baço ([Schimming & Silva, 2012](#)).

A sintomatologia de um cão com Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é bastante variável, podendo ser de forma assintomática, oligossintomática ou sintomática. A forma assintomática é a mais comum, o que torna dificultada a percepção da infecção no animal ([Faria & Andrade, 2012](#)). Em casos de cães sintomáticos, os sintomas são bem peculiares, além da supressão do sistema imune. As lesões cutâneas são comuns na leishmaniose visceral canina, assim como na tegumentar, onde surgem sinais dermatológicos, principalmente ao redor dos olhos e no focinho. Os animais acometidos podem apresentar ceratoconjuntivite, paresia dos membros, acometer órgãos internos ([Camargo et al., 2007](#)), além de hepatomegalia e esplenomegalia, apatia, perda de peso e onicogribose ([Faria & Andrade, 2012](#)).

Apesar da análise clínica do animal infectado em busca de sintomas e sinais da doença, fica clara a necessidade de realização de diagnósticos laboratoriais, seja ele um teste rápido, confirmatório e/ou diferencial, porém sensível e específico. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi realizar um levantamento de estudos relacionando os parâmetros intrínsecos dos diferentes testes imunológicos e moleculares no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, enfocando suas vantagens e limitações.

Patogenia

A patogênese da LVC é semelhante a infecção no humano. Assim que a fêmea do mosquito inocula as promastigotas no tecido do animal, o processo inflamatório se inicia. As substâncias vasoativas e quimiotáticas, associadas ao aumento da expressão celular de moléculas de adesão, irão causar a diapedese dos leucócitos para o sítio infeccioso, o que, juntamente com o plasma sanguíneo, desencadeia o edema tecidual e demais sinais da inflamação ([Abbas et al., 2008](#)). Após a fagocitose, as células podem apresentar em sua superfície fragmentos antigênicos da *Leishmania*, juntamente às moléculas de MHC classe I, aos linfócitos T citotóxicos. O reconhecimento via receptores da célula T (TCR-CD3), ativa as células TCD8+, que irão causar destruição da célula infectada. Além disso, é estimulada a produção de interferon-gama (IFN- γ), o que causa maior ativação de macrófagos ([Coelho-Castelo et al., 2009](#)). Outra subpopulação de macrófagos irá ativar os linfócitos TCD4+, através da apresentação de epítopos associados as moléculas de MHC classe II. Estes se diferenciam em Th1 (consideradas citocinas pró-inflamatórias) que irá mediar a resposta celular e Th2 (citocinas anti-inflamatórias) que irá atuar para uma resposta humoral, agindo na maturação específica de linfócitos B em plasmócitos ([Machado et al., 2004](#)).

O *Leishmania chagasi* possui a habilidade de liberar substâncias que inibem sua destruição pelos macrófagos, o que os permite proliferar dentro dos vacúolos parasitófagos. Outro fator importante para a sobrevivência do parasito no hospedeiro é sua capacidade de inibir a ação do sistema complemento. Segundo Silva (2007), isso ocorre devido a presença de glicofosfolipano (LPG) e proteína quinase da *Leishmania* (LPK-1) na membrana celular do parasita. Essas moléculas inibem a ação do complexo de ataque à membrana (MAC), impedindo a lise pelo complemento. Ao invadir o macrófago, o LPG impede a união do lisossomo com o fagossomo, inibindo a liberação de enzimas proteolíticas pelos leucócitos.

O fato de a doença causar inflamação exacerbada está ligado à sua indução da produção de IL-12 pelo organismo, citocina que estimula a resposta celular do tipo Th1, diminuindo a resposta do tipo Th2 ([Silva, 2007](#)). Além do estímulo para a inflamação, é liberado citocina IFN- γ que estimula maior

ativação de macrófagos. Para realizar o equilíbrio no sistema imunológico do animal, os linfócitos TCD4+ do tipo Th2 liberam interleucina-10 (IL-10) e interleucina-4 (IL-4) que possuem as funções de inibir a IL-12 e aumentar sua ativação, respectivamente. Juntas, as citocinas vão auxiliar na síntese de anticorpos, ou seja, a IL-10 atua como molécula coestimulatória para crescimento de linfócitos imaturos, enquanto a IL-4 auxilia na expressão aumentada do MHC classe II, resultando na diferenciação dos linfócitos B, além de induzir maior síntese de imunoglobulinas. A ativação do linfócito B ocorre por citocinas Th2, que irão induzir sua transformação em plasmócito, para a síntese de anticorpos específicos no intuito de combater o protozoário da LVC (Mesquita Júnior et al., 2010). Esse aumento de anticorpos pode ser notado em exames bioquímicos realizados em laboratório, no qual pode-se identificar uma inversão da razão de albumina/globulina e do aumento das proteínas totais no sangue do animal, o que indica uma resposta imunológica contra algum antígeno presente no organismo do cão (Dias, 2008). Com isso, podem ser utilizados os anticorpos presentes no soro do animal para a realização de testes de imunodiagnóstico na detecção de *Leishmania chagasi* no indivíduo.

Antes de análises clínicas mais onerosas e elaboradas que detectem com maior precisão a presença da doença nos cães, podem ser realizados testes rápidos, com menor custo e de fácil acesso para uma triagem do animal suspeito. Observando os sintomas do animal, juntamente a anamnese, é possível a realização do teste imunocromatográfico DPP® LVC. Trata-se de um teste que, por meio de amostras sanguíneas do paciente, verifica a necessidade de confirmação por testes mais precisos (Bisugo et al., 2007). Este teste é baseado na procura de anticorpos para o parasito no animal, com o surgimento de duas linhas de leitura. É descrito como o único no mercado mundial com esta tecnologia, o que facilita a leitura em campo e também aumenta a sua especificidade e sensibilidade (FIOCRUZ/Bio-Manguinhos, 2020).

Parasitológico

Como diagnóstico de certeza, um dos principais teste utilizados é o exame parasitológico em amostras teciduais. Esse exame tem por finalidade analisar microscopicamente o material biológico coletado, na busca de amastigotas e/ou macrófagos infectados. A coleta do material é feita através de aspirados e/ou punção dos tecidos que são mais propensos a infecção do parasito. Também pode ser realizada a coleta de sangue, devido presença de promastigotas circulantes na corrente sanguínea. Com o material coletado, é realizada a busca ativa do parasito em microscópio óptico (Souza et al., 2013). A sua sensibilidade varia de acordo com o tecido no qual foi obtido o aspirado. Segundo Laurenti (2009), o exame parasitológico apresenta sensibilidade de 50% a 83% em aspirado de medula óssea, 30% a 85% de linfonodos e 71% a 91% quando combinados ambos os tecidos. De acordo com Faria & Andrade (2012), a sensibilidade de aspirado do linfonodo é de 40%, medula óssea de 50% a 85%, enquanto o baço apresenta a maior sensibilidade de 98%. Souza et al. (2013) enfatizam a sensibilidade de 90% a 100% para a análise de aspirado do baço para essa doença. Em relação a especificidade, os autores citados declaram o exame parasitológico como sendo “padrão-ouro”, uma vez que a visualização de protozoários nos aspirados dos órgãos é um diagnóstico de certeza. Além disso, o teste de imunohistoquímica tem sensibilidade de 62,1% e especificidade variável, com 92,6% para cães sintomáticos, 60% para os oligossintomáticos e 73,9% para os assintomáticos (Faria & Andrade, 2012).

Para que a suspeita clínica ou o teste de triagem seja confirmado, ou ainda o diagnóstico seja finalizado, é de extrema importância a utilização de testes sorológicos confirmatórios, como o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (Alves, 2009). Tanto o ELISA, variação indireta, quanto o RIFI têm como finalidade a detecção de imunoglobulina G (IgG) no soro dos cães suspeitos. Quando presentes, há indicação de que o animal entrou em contato com o protozoário da leishmaniose. Tais exames são escolhidos devido a especificidade, e sensibilidade apresentada.

ELISA

Trata-se de um método empregado para a pesquisa de inúmeras doenças, inclusive a leishmaniose visceral. A busca por antígenos ou anticorpos se dá pela indução do processo de reação entre os mesmos, junto a adição de uma enzima (comumente, a peroxidase) para que ocorra a reação ao anticorpo (caso esteja presente) e propiciar a visualização a partir de coloração (Travi et al., 2018). A procura do antígeno é feita através da utilização de anticorpos anti-*Leishmania* presentes na placa de poliestireno,

onde é colocado as amostras a serem testadas buscando o sinal indicativo da reação antígeno-anticorpo, ou seja, indivíduo infectado. Este tipo utilizado é denominado de ELISA direto (Porrozzi et al., 2007); enquanto o ELISA indireto utiliza antígenos específicos da *Leishmania* que são adsorvidos à placa de ELISA, para a busca de anticorpos no soro do paciente, variação mais utilizada pelos laboratórios (Faria et al., 2017). Esse teste possui dois métodos que podem ser utilizados para a verificação, são eles: método de captura e competitivo. O método de sanduiche, como também é chamado o método de captura, é realizado a partir da utilização de dois anticorpos, podendo ser eles monoclonais ou policlonais, onde a primeira camada de anticorpos é usada para revestir a placa, seguido da adição do soro do animal contendo o antígeno específico, ocorrendo a reação (Maia & Campino, 2008). Após isso, um segundo anticorpo ligado a enzima é adicionado e vai se ligar ao antígeno que, por estar ligado a enzima a reação possui coloração, permitindo a visualização, onde a intensidade da cor está relacionada a quantidade de ligação ocorrida (García et al., 2017).

No método do ELISA competitivo, a placa é sensibilizada com antígeno ou com anticorpo. Caso seja sensibilizada com antígeno, é adicionado soro do animal mais anticorpos com a enzima acoplada. Caso o animal possua anticorpos formados contra o antígeno, esses irão ter uma prevalência a se ligarem aos antígenos da placa, deixando a cor mais clara. Caso os anticorpos no soro forem inexistentes ou baixa carga, a coloração fica mais escura. O método competitivo com sensibilização da placa com anticorpos é o mesmo processo; porém, é adicionado antígeno ligado a enzima, onde se houver antígeno no soro do animal, esses se ligaram a placa e não os acoplados a enzimas (Hirschmann et al., 2015).

Os antígenos utilizados para a realização de cada um desses testes apresentam-se de forma bruta, sintética ou recombinante. Nesse sentido, dependendo da forma utilizada, implica em variação nos valores de porcentagem de sensibilidade e especificidade do teste em questão (Dantas, 2004).

No teste de ELISA, a especificidade varia de 81 a 100%, e a sensibilidade, abrange entre 80 a 99,5%, conforme [tabela 1](#). Nos testes de ELISA, a porcentagem da sensibilidade e especificidade desconsideram o tipo de antígeno empregado.

Tabela 1. Perfil de especificidade e sensibilidade do teste de ELISA para LCV, de acordo com a literatura pesquisada.

Estudos	Especificidade	Sensibilidade
Laurenti (2009)	81% - 100%	80% - 99,5%
Oliveira et al. (2005)	100%	90%
Faria & Andrade (2012)	98,8%	97,1%
Peñuela & Valencia(2007)	86% - 98%	85% - 96%

RIFI

A imunofluorescência indireta é outro teste sorológico muito aplicado para confirmação de infecção por *Leishmania sp.*, muitas vezes realizado juntamente ao ELISA para uma melhor confiabilidade no diagnóstico do animal. Trata-se de um teste realizado através da diluição do soro do paciente em solução salina, buscando a titulação máxima que é possível a visualização de fluorescência na lâmina (Aoki et al., 2010). As amostras dos animais suspeitos são diluídas em solução salina tamponada e adicionadas a lâminas impregnadas com antígenos específicos de *Leishmania major*. Posteriormente, é adicionado anticorpos anti-IgG para *Leishmania spp.* que estão marcados com fluorocromo, permitindo o efeito da fluorescência. Se houver ligação desses anticorpos conjugados, significa que o soro do animal possui IgG contra o antígeno em questão. O padrão adotado para reagente é diluição inicial de 1/40, porém em casos de leishmaniose visceral, são geralmente encontrados títulos elevados, devido a elevada carga parasitaria nessa doença (Luciano et al., 2009). O teste de imunofluorescência indireta possui 80 a 100% de especificidade, e 40 a 100% de sensibilidade, conforme literatura indicada na [tabela 2](#).

Tabela 2. Perfil de especificidade e sensibilidade do teste de RIFI para LCV, de acordo com a literatura pesquisada.

Estudos	Especificidade	Sensibilidade
Laurenti (2009)	80% - 100%	90% - 100%
Maia & Campino (2015)	80%	90%
Alves (2009)	80%	90% - 100%
Faria & Andrade (2012)	80%	83% - 100%

Ambos os testes sorológicos possuem conveniências e desvantagens em relação ao seu uso. O ELISA tem como vantagens o fato de ser de fácil execução e leitura, com resultado rápido e poder ser adaptado para estudos epidemiológicos. Como desvantagens, a autora relata o fato de ser pouco preciso em casos subclínicos ou assintomáticos, com possibilidade de reação cruzada com outros tripanossomatídeos e ser de custo elevado.

Em relação ao RIFI, os autores ressaltam como desvantagens, a mesma possibilidade de reação cruzada do ELISA, necessidade de profissional treinado para sua realização e por ser um teste dispendioso (Luciano et al., 2009). As prerrogativas do RIFI, segundo Faria & Andrade (2012), seriam a utilidade para estudos epidemiológicos e utilização para monitoramento de animais doentes em uma determinada região.

Tanto o ELISA quanto o RIFI possuem melhores resultados em cães que já estejam desenvolvendo sintomas, devido a maior carga parasitária circulante no organismo, o que resulta em maior sensibilidade dos testes (Luciano et al., 2009, Faria & Andrade, 2012).

Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Criado na década de oitenta, outra técnica que vem ganhando espaço e sendo utilizada no diagnóstico diferencial para os vários agentes etiológicos da LVC é a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (Rolim et al., 2016). Trata-se de uma técnica com a capacidade de amplificar sequências de bases nitrogenadas do DNA ou RNA. Sua utilidade para as espécies da *Leishmania* se dá pela busca de DNA do parasito no tecido do animal (Mesquita et al., 2001). O teste é feito através da amplificação do DNA do protozoário de 120 pares de bases nitrogenadas, que pode ser extraído de diversos tecidos do animal, utilizando o par de oligonucleotídeos para *Leishmania sp*: 13A 5'-dGTG GGG GAG GGG CGT TCT-3' e 13B 5'-dATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3. O processo realizado no teste do PCR é feito através da desnaturação da fita de DNA molde, sendo seguido da adição dos segmentos de ácidos nucléicos (primers). Então, a polimerase irá adicionar as bases nitrogenadas complementares à fita molde para posterior análise e verificação dessa fita de DNA, buscando visualizar um genoma páreo ao dos protozoários da leishmaniose (Queiroz et al., 2010). Em relação ao protozoário da leishmaniose visceral, esse teste tem sido utilizado não só para diagnóstico, mas também para monitoramento de tratamento e estudos epidemiológicos (Gontijo & Melo, 2004). Apresenta de 55 a 100% de especificidade e 66 a 97% de sensibilidade, conforme dados da literatura (Tabela 3).

Tabela 3. Perfil de especificidade e sensibilidade do teste de PCR para LCV, de acordo com a literatura.

Estudos	Especificidade	Sensibilidade
Faria & Andrade (2012)	67%	97%
Rolim et al. (2016)	93,5%	86,2%
Queiroz et al. (2010)	55%	66,3%
Martins (2013)	86,96% - 100%	73,08% - 96,15%

Considerações finais

A leishmaniose visceral é uma doença ainda pouco esclarecida na população leiga, porém sua incidência vem aumentando durante os últimos anos, devido alterações ambientais que geram a urbanização da enfermidade. É uma doença com grande importância epidemiológica, principalmente pela aparição de formas graves, com morte do animal doente e transmissão em potencial para os humanos. Tendo em vista os fatores de risco envolvidos na LVC, foram desenvolvidas diversas técnicas para seu diagnóstico, cada qual com vantagens e desvantagens na sua realização e interpretação. Entretanto, observa-se que o ELISA e o RIFI possuem uma maior relevância por apresentarem, no geral, especificidade e sensibilidade superiores aos demais ensaios diagnósticos. Todavia, mesmo com um possível tratamento para a doença, ainda é preconizado pelos órgãos competentes a eutanásia do animal, uma vez que o tratamento pode não eliminar todos os parasitas do sangue do animal, tornando viável sua transmissão zoonótica.

Referências

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2008). *Imunologia celular e molecular*. Elsevier Brasil.
- Alves, W. A. (2009). Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. *BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista*, 6(71), 25–29.

- Aoki, V., Sousa Jr, J. X., Fukumori, L. M. I., Périgo, A. M., Freitas, E. L., & Oliveira, Z. N. P. (2010). Imunofluorescência direta e indireta. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85(4), 490–500. <https://doi.org/10.1590/s0365-05962010000400010>.
- Bisugo, M. C., Araújo, M. F. L., Taniguchi, H. H., Acunha, E., Santos, A. A., Spessoto Junior, M., Kaneto, C. N., Camargo, C. V., Polizel, M. A., & Vigilato, M. A. (2007). Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do estado de São Paulo. *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*, 66(2), 185–193.
- Bondan, E., & Camargo, T. (2015). Conhecimento sobre leishmaniose visceral canina na população do Município de Cotia (SP), Brasil, e participação dos clínicos veterinários locais na propagação de medidas preventivas. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 22(1), 28–33.
- Camargo, J. B., Troncarelli, M. Z., Ribeiro, M. G., & Langoni, H. (2007). Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. *Clín Ica Veterinária*, 71, 86–92.
- Coelho-Castelo, A. A. M., Trombone, A. P. F., Rocha, C. D., & Lorenzi, J. C. C. (2009). Resposta imune a doenças infecciosas. *Medicina*, 42(2), 127–142. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v42i2p127-142>.
- Dantas, T. V. M. (2004). *Desenvolvimento e padronização de ELISA indireto para diagnóstico de Maedi-visna vírus de ovinos*. Universidade Estadual do Ceará.
- Dias, C. A. (2008). *Estudo das alterações clínico-laboratoriais e histopatológicas renais em cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados no Distrito Federal*. Universidade de Brasília.
- Faria, A. R., & Andrade, H. M. (2012). Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 3(2), 47–57.
- Faria, A. R., Pires, S. F., Reis, A. B., Coura-Vital, W., Silveira, J. A. G., de Sousa, G. M., Bueno, M. L. C., Gazzinelli, R. T., & Andrade, H. M. (2017). Canine visceral leishmaniasis follow-up: a new anti-IgG serological test more sensitive than ITS-1 conventional PCR. *Veterinary Parasitology*, 248, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.020>.
- FIOCRUZ/Bio-Manguinhos, (2020). DPP® Leishmaniose Canina. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/produtos/reativos/testes-rapidos/dppr-leishmaniose-canina>. Acesso em: 05 fev. 2021.
- García, V. S., Gonzalez, V. D. G., Gugliotta, L., Burna, A., Demonte, A., Arias, D. G., Cabeza, M. S., & Guerrero, S. A. (2017). Development of a simple and economical diagnostic test for canine leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 182, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.08.011>.
- Gontijo, C. M. F., & Melo, M. N. (2004). Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7(3), 338–349.
- Greene, C. E. (2006). Fatores ambientais de doenças infecciosas. In E. D. Ibid (Ed.), *Doenças infecciosas em cães e gatos*. Elsevier.
- Hirschmann, L. C., Brod, C. S., Radin, J., Simon, C. F., & Recuero, A. L. C. (2015). Leishmaniose visceral canina: comparação de métodos sorológicos em cães de área indene do Rio Grande do Sul no Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 44(1), 33–44. <https://doi.org/10.5216/rpt.v44i1.34799>.
- Laurenti, M. D. (2009). Laurenti, M. D. (2009). Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. *Bepa*;6(67):13-23. *Boletim Epidemiológico Paulista*, 6(67), 13–23.
- Luciano, R. M., Lucheis, S. B., Troncarelli, M. Z., Luciano, D. M., & Langoni, H. (2009). Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 46(3), 181–187. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2009.26765>.
- Machado, P. R. L., Araújo, M. I. A. S., Carvalho, L., & Carvalho, E. M. (2004). Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 79(6), 647–662. <https://doi.org/10.1590/s0365-05962004000600002>.
- Maia, C., & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158(4), 274–287.

- <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.028>.
- Martins, T. F. C. (2013). *Análise da eficiência da PCR com identificação específica do agente etiológico para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina*. Universidade de São Paulo.
- Megid, J., Ribeiro, M. G., & Paes, A. C. (2016). *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia*. Roca.
- Mesquita Júnior, D., Araújo, J. A. P., Catelan, T. T. T., Souza, A. W. S., Cruvinel, W. de M., Andrade, L. E. C., & Silva, N. P. (2010). Sistema imunitário–parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 50(5), 552–580. <https://doi.org/10.1590/s0482-50042010000500008>.
- Mesquita, R. A., Anzai, E. K., Oliveira, R. N., & Nunes, F. D. (2001). Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesquisa Odontologica Brasileira*, 15(4), 314–318.
- Monteiro, E. M., Silva, J. C. F., Costa, R. T., Costa, D. C., Barata, R. A., Paula, E. V., Machado-Coelho, G. L. L., Rocha, M. F., Fortes-Dias, C. L., & Dias, E. S. (2005). Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(2), 147–152.
- Oliveira, L. S., Silva Julião, F., Souza, V. M. M., Freitas, D. S., Souza, B. M. P. S., Paule, B. J. A., Aguiar, P. H. P., Melo, S. M. B., & Franke, C. R. (2005). A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. *Ciência Animal Brasileira*, 6(1), 41–47.
- Peñuela, M. R., & Valencia, J. A. S. (2007). Una mirada a la epidemiología y al control de la leishmaniasis zoonótica en Colombia. *Biosalud*, 99–111.
- Porrozzi, R., Costa, M. V. S., Teva, A., Falqueto, A., Ferreira, A. L., dos Santos, C. D., Fernandes, A. P., Gazzinelli, R. T., Campos-Neto, A., & Grimaldi Júnior, G. (2007). Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(5), 544–548. <https://doi.org/10.1128/CVI.00420-06>.
- Queiroz, N. N. M. G. P., Assis, J. de, Oliveira, T. T. M. F. S., Machado, R. Z., Nunes, C. M., & Starke-Buzetti, W. A. (2010). Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19(1), 32–38.
- Rolim, F., Carvalho, F. L. N., Bello, G. L., Gehlen, M., Halon, M. L., Lemos, R. R., & Barcellos, R. B. (2016). Leishmaniose visceral canina: detecção de DNA em soro por PCR em tempo real. *Revista de Iniciação Científica Da ULBRA*, 14.
- Schimming, B. C., & Silva, J. R. C. P. (2012). Leishmaniose visceral canina – Revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 10(18), 1–5.
- Silva, A. A. L. (2007). Estudo clínico-laboratorial das articulações de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral e experimentalmente inoculados com *Leishmania chagasi* por via intra-articular. In *Faculdade de Odontologia: Vol. Master of*. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia –.
- Silva, F. S. (2007). Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Tropical – Ciências Agrárias e Biológicas*, 1(1), 20–31.
- Souza, Y. C. P., Carvalho, A. F. S., Carvalho, L. A. R., & Mansur, V. F. R. (2013). Testes diagnósticos para leishmaniose visceral: atualidade e perspectivas. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 11(21), 1–16.
- Travi, B. L., Cordeiro-da-Silva, A., Dantas-Torres, F., & Miró, G. (2018). Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(1), e0006082. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006082>.

Histórico do artigo:

Recebido: 28 de fevereiro de 2021

Aprovado: 25 de abril de 2021

Licenciamento: Este artigo é publicado na modalidade Acesso Aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados