
ESTUDO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA, GOIÁS, BRASIL

Elisa Maria Rennó Azevedo, ¹ Sabrina Castilho Duarte, ¹ Herika Xavier Da Costa, ² Carlos Eduardo Fonseca Alves, ³ Osvaldo José Da Silveira Neto, ¹ Valéria De Sá Jayme ¹ e Guido Fontgalland Coelho Linhares ¹

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose causada por *Leishmania infantum chagasi*. Canídeos desempenham importante papel epidemiológico por atuarem como reservatórios naturais. Este trabalho teve como objetivo conduzir uma investigação sobre leishmaniose visceral canina (LVC) em cães na cidade de Goiânia-GO. Para o estudo, foram utilizados 214 animais sintomáticos e assintomáticos e colhidas amostras de sangue, biópsias de pele e aspirados de linfonodo. Nos testes sorológicos pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), 20 animais apresentaram resultados positivos. No exame parasitológico direto, foram detectadas amastigotas em seis amostras. Os testes pela reação em cadeia da polimerase (PCR), realizados apenas nos animais sintomáticos ou com resultado positivo em pelo menos um dos exames anteriores (n=81), foram positivos para sete cães. As amostras positivas no exame parasitológico foram também submetidas à PCR. Das 20 amostras positivas nos testes pela RIFI, apenas sete foram confirmadas pela PCR. Os resultados positivos pela PCR espécie-específica, nas sete amostras, confirmaram a identidade molecular de *L. i. chagasi* nestes animais. Os resultados registraram os primeiros casos autóctones em Caldas Novas-GO e Novo Brasil-GO e evidenciaram a necessidade urgente de intensificação das estratégias de controle da LVC nestes municípios. O estudo revelou a existência de casos de LVC em cães que buscam atendimento clínico na cidade de Goiânia.

DESCRITORES: *Leishmania infantum chagasi*. Saúde pública. Diagnóstico molecular. Exame parasitológico. Reservatório urbano. Reação de imunofluorescência indireta.

-
- 1 Laboratório de Doenças Parasitárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás (UFG);
 - 2 Mestranda em Ciência Animal, Sanidade Animal, UFG;
 - 3 Médico Veterinário, União Pioneira de Integração Social (UPIS).

Endereço para correspondência: Dr. Guido F. C. Linhares, Laboratório de Doenças Parasitárias, Escola de Veterinária da UFG, Campus II, Caixa postal 131 CEP: 74001-970, Goiânia, GO, Brasil. E-mail: guidofcl@vet.ufg.br.

Recebido para publicação em: 29/11/2010. Revisto em: 25/5/2011. Aceito em: 8/6/2011.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de evolução crônica causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, de grande importância na América do Sul, especialmente no Brasil (Desjeux, 2004; Shaw, 2006).

Os canídeos, por atuarem como os principais reservatórios naturais, desempenham importante papel na epidemiologia. No Brasil, as espécies *Dusicyon ventulus*, *Cerdocyon thous* e *Chrysocyon brachyurus* são reservatórios silvestres, enquanto *Canis familiaris* atua como reservatório doméstico (Gontijo & Melo, 2004). Estes animais, por apresentarem elevada intensidade parasitária de formas amastigotas na pele, são altamente eficientes na manutenção do parasito nos focos endêmicos, o que favorece a infecção dos vetores (Moreno & Avar, 2002; OMS, 2006). As espécies de flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* constituem vetores biológicos no Brasil (Santos et al., 1998; Neves et al., 2005).

Como métodos convencionais de diagnóstico laboratorial da LV, são empregados o exame parasitológico direto e as técnicas sorológicas. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imuno enzimático indireto (ELISA) são os testes sorológicos recomendados pelo Ministério da Saúde (MS) para estudos de soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários. Para áreas não endêmicas, o MS indica o exame parasitológico direto como método confirmatório para cães com sorologia positiva em virtude de sua elevada especificidade (Brasil, 2006). Os métodos sorológicos possuem elevada sensibilidade, no entanto têm sido relatadas reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas e outras tripanossomoses (Baneth & Aroch, 2008, Gomes et al., 2008., Troncarelli et al., 2008).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método que apresenta alta sensibilidade e especificidade na detecção direta do DNA, no entanto há restrições para a sua aplicação em inquéritos epidemiológicos em razão do elevado custo dos equipamentos, da necessidade de pessoal altamente qualificado e de dificuldades inerentes à padronização da técnica (Gomes et al., 2007).

Apesar do aumento do número de casos de LV no estado de Goiás nos últimos anos, até a presente data, o município de Goiânia não é considerado endêmico para a enfermidade. No entanto, de acordo com o Ministério da Saúde, Goiânia enquadra-se como “área vulnerável” por causa do fluxo migratório intenso, por sua localização em eixo viário comum a municípios com casos autóctones e por sua condição de “área silenciosa”, já que não há registro de casos autóctones ou transmissão de LV ou LVC em seu território (Brasil, 2006; Brasil, 2009).

Este trabalho teve como objetivo conduzir uma investigação sorológica, parasitológica e molecular sobre LVC em cães errantes mantidos no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Goiânia e em cães atendidos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (HV/UFG).

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do estudo, foram utilizados 214 cães, sendo 174 mantidos no CCZ de Goiânia (animais errantes capturados e retirados das ruas da cidade de Goiânia) e 40 atendidos para consulta no HV/UFG no período de 04 de fevereiro a 12 de dezembro de 2009. A seleção dos animais, por conveniência, não teve como critério a realização de qualquer exame laboratorial prévio para triagem.

Os animais foram classificados em dois grupos conforme a apresentação clínica, sendo um grupo formado por animais assintomáticos para LVC (n=141) e outro por sintomáticos (n=73). Para considerar um animal sintomático, adotou-se como critério a apresentação de pelo menos três sinais clínicos compatíveis com a enfermidade, conforme está descrito no Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (Brasil, 2006).

Considerando-se que o município de Goiânia é reconhecido como área não endêmica para LV e com base nas recomendações do Ministério da Saúde, foi utilizado o teste sorológico RIFI como método de triagem e o exame parasitológico direto como método confirmatório. Para efeito de estudo, este último foi realizado em todos os animais, independentemente de serem ou não sintomáticos. A PCR foi empregada como um segundo método confirmatório, mas somente para os cães com sorologia positiva e/ou sintomáticos.

Foram, portanto, colhidas amostras de sangue sem anticoagulante para obtenção do soro, dois fragmentos de pele íntegra da face interna da aurícula (biópsia) e aspirado de linfonodo poplíteo. Logo após a coleta do material, os animais foram liberados para seus destinos de origem e nenhum deles foi mantido em experimento para outros estudos.

Aliquotas de soro foram utilizadas para testes de RIFI sendo consideradas positivas as amostras com diluição igual ou superior a 1:40, conforme protocolo descrito por Oliveira et al. (2008). Como antígeno, utilizou-se substrato antigênico obtido de promastigotas de *L. i. chagasi* cultivadas em meio RPMI 1640, a 25 °C (Assis et al., 2010). Os antígenos, assim como os soros de controle positivo e negativo procediam do Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP-Jaboticabal. Como anticorpo na reação, empregou-se o anti-IgG canino conjugado ao isotiocianato de fluoresceína, diluído conforme as recomendações do fabricante (KPL, USA).

Imediatamente após a coleta, as amostras de pele foram utilizadas para preparações citológicas por aposição (*imprint*) em lâminas de microscopia. Dos aspirados de linfonodo foram preparados esfregaços delgados em lâminas. Em seguida, as lâminas foram fixadas em metanol por cinco minutos e coradas pelo Giemsa. Após a coloração, as lâminas foram examinadas em microscopia de luz (500x e 1.000x) para a pesquisa e identificação de formas amastigotas, conforme características morfológicas típicas do gênero *Leishmania* (Michalick, 2005).

Com base nas amostras de pele e nos aspirados de linfonodo recém-colhidos, procedeu-se à extração de DNA empregando o *kit* comercial Ilustra™ *GE Healthcare*®. As etapas de extração foram executadas de acordo com as instruções do fabricante.

Na PCR, foi utilizado o par de iniciadores RV1 (5'-cttttctggtcccgcggtagg-3') /RV2 (5'-ccacctggcctattttacacca-3') para a amplificação espécie-específica do fragmento de 145 pb de minicírculos do kDNA de *L. i. chagasi*, segundo Fichoux et al. (1999). Para controle positivo da reação, utilizou-se o DNA extraído do mesmo cultivo de promastigotas de *L. i. chagasi* citado acima. Água ultrapura esterilizada (*DNase/RNase-Free Destilled Water, Invitrogen*) foi usada como controle negativo.

Para avaliar a concordância entre os métodos de diagnóstico utilizados no estudo, os resultados foram analisados pelo teste estatístico Kappa, com intervalo de confiança de 95% (Landis & Koch, 1977). O teste do qui-quadrado (grau de liberdade 1 e significância de 5%) foi aplicado para verificar a associação estatística entre a variável “animal sintomático” e o resultado dos testes diagnósticos (Thrusfield, 1995).

RESULTADOS

Entre os sinais clínicos observados nos cães sintomáticos, foram registrados: conjuntivite, linfadenopatia, alterações dermatológicas (alopécia, eczema furfuráceo, lesões ulcerativas, hiperqueratose), perda de peso e onicogribose. Estes são frequentemente considerados sinais compatíveis com a LVC (Amusatogui et al., 2003; Alvar et al., 2004).

Do total de 214 cães testados pela sorologia, 20 (9,3%) mostraram-se positivos. Entre os 73 classificados como sintomáticos, 12 (16,4%) apresentaram resultados positivos e 61 (83,6%), resultados negativos. Com relação ao grupo assintomático (n=141), 8 (5,7%) foram identificados no teste como positivos e 133 (94,3%), como negativos (Tabela 1).

No exame parasitológico direto das 214 amostras de pele, foram detectadas amastigotas em 6 (2,8%) destas. Dos 73 animais sintomáticos, 5 (6,8%) foram identificados como positivos (Figura 1) e os outros 68 (93,2%), como negativos. Um animal (0,7%) entre os 141 assintomáticos revelou-se positivo neste exame e os outros 140 (99,3%) foram encontrados negativos (Tabela 1).

Os resultados dos exames parasitológicos obtidos dos aspirados de linfonodo foram semelhantes aos de pele, com exceção de um animal assintomático que se revelou positivo apenas no exame da amostra de pele.

Conforme o critério estabelecido, os testes pela PCR foram realizados em 81 amostras. Destas, sete (8,6%) foram positivas e 74 (91,4%) negativas (Figura 2). Entre as positivas, seis correspondiam a cães sintomáticos e apenas uma a animal assintomático. Amostras identificadas como positivas no exame parasitológico também foram positivas quando examinadas pela PCR. Das 20 amostras positivas pela RIFI, apenas 7 foram confirmadas pela PCR.

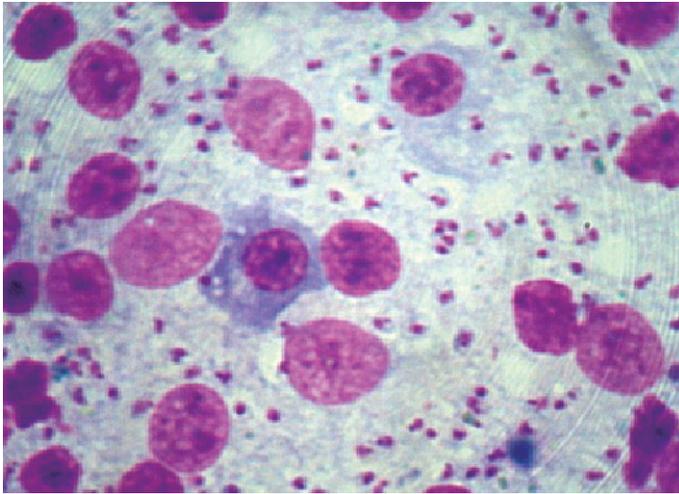


Figura 1. Formas amastigotas de *Leishmania* sp. observadas no exame parasitológico direto em amostra de linfonodo de cão sintomático para LVC, atendido no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás, procedente do município de Caldas Novas.

Tabela 1. Frequência absoluta e relativa dos resultados de exames pela RIFI e parasitológico direto para LVC, realizados em cães no município de Goiânia

	RIFI		Parasitológico Direto		Total
	Pos.	Neg.	Pos.*	Neg.**	
Sintomático	12(16,4%)	61(83,6%)	5(6,8%)	68(93,2%)	73
Assintomático	8(5,7%)	133(94,3%)	1(0,7%)	140(99,3%)	141
Total	20(9,3%)	194(90,6%)	6(2,8%)	208(97,2%)	214

*Resultado positivo independentemente do tipo de amostra (pele ou linfonodo).

**Resultados negativos tanto para amostras de pele como para linfonodo.

Os resultados positivos por PCR espécie-específica em sete amostras confirmaram a identidade molecular de *L. i. chagasi* nos animais examinados.

Neste estudo, apenas sete cães foram classificados como infectados, considerando-se os resultados dos testes positivos da PCR e/ou parasitológico, aplicados como métodos confirmatórios para o diagnóstico de LVC. Nenhum destes animais era comprovadamente domiciliado no município de Goiânia. Quatro deles tiveram a procedência registrada no atendimento do HV/UFG, sendo dois de Caldas Novas, um de Novo Brasil, ambos municípios goianos, e um da cidade de Belo Horizonte, capital de Minas Gerais. Na anamnese realizada durante a consulta, constatou-se que os cães procedentes de Caldas Novas e Novo Brasil eram nascidos

e criados nos respectivos municípios de origem, sem histórico de deslocamentos para outras áreas. Os outros três eram animais errantes, capturados no município de Goiânia e mantidos sob a guarda do CCZ-Goiânia, sem identificação que permitisse a comprovação de domicílio ou origem.

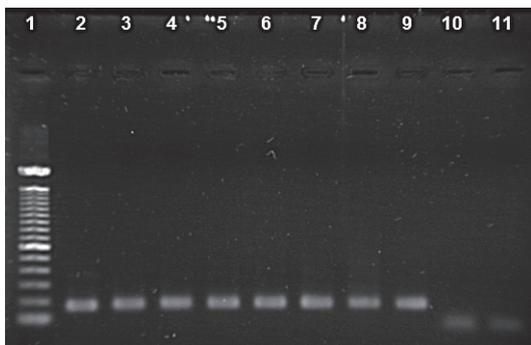


Figura 2. Eletroforese de produtos de PCR com o par de iniciadores (RV1/RV2), específico para o fragmento de 145 pb de minicírculos do kDNA de *Leishmania infantum chagasi*: 1- marcador molecular de 100pb; 2- controle positivo para *L. i. chagasi*; 3 a 9- amostras positivas; 10- controle negativo; 11- DNA de cão sadio.

A interpretação dos valores Kappa revelou “concordância moderada” (Kappa geral = 0,44; P-valor geral <0,001) entre a RIFI e o exame parasitológico, assim como entre RIFI e PCR, e “concordância quase perfeita” (Kappa geral = 0,92; P-valor geral <0,001) entre PCR e exame parasitológico. Pela análise das variáveis *teste de diagnóstico* e *apresentação clínica*, verificou-se associação estatisticamente significativa entre o resultado da RIFI e o fato de o animal ser sintomático ou não ($P>0,05$). Isso não ocorreu entre o exame direto e a condição clínica dos animais.

DISCUSSÃO

A presença de cães portadores de LVC no município de Goiânia representa risco potencial para a saúde pública, uma vez que estes animais atuam como fonte de infecção para os vetores flebotômicos (Travi et al., 2001; Michalick, 2005). Três animais avaliados neste estudo eram cães com origem desconhecida oriundos do CCZ. Estes poderiam ser procedentes de outras regiões das quais se evadiram ou mesmo terem sido abandonados dentro do município de Goiânia. Por este motivo, não foi possível chegar a conclusões quanto à autoctonia destes casos. Portanto, os resultados alcançados neste estudo não alteram a condição epidemiológica de área “não endêmica” ou área “silenciosa” do município de Goiânia com relação à LVC. Contudo, é importante salientar que a introdução de *L. longipalpis* no município poderia estabelecer condições favoráveis à autoctonia da enfermidade.

Entre os 20 resultados positivos pela RIFI, 13 foram negativos nos exames confirmatórios (PCR e/ou parasitológico). A falta de concordância entre estes métodos tem sido frequentemente apontada em artigos de pesquisa, no entanto a não confirmação do resultado sorológico pelos exames diretos não descarta a possibilidade de o cão ser, de fato, portador (Iniesta et al., 2002; Reithinger et al., 2003; Riera et al., 2004). Por outro lado, resultados falso-positivos na sorologia podem ocorrer ante determinantes antigênicos comuns a outras espécies de protozoários com estreita relação filogenética, especialmente aquelas pertencentes ao mesmo gênero como *Leishmania braziliensis* ou *Leishmania amazonensis*, agentes da leishmaniose tegumentar americana (LTA) (Tolezano et al., 2007; Quaresma et al., 2009). Esta é uma possibilidade que deve ser considerada com relação aos resultados deste estudo, uma vez que a LTA é uma enfermidade endêmica no estado de Goiás. Isso deve também ser considerado em relação à infecção por *Trypanosoma cruzi*, agente da doença de Chagas, apontado por outros autores como causa frequente de resultados falso-positivos nos testes sorológicos para LVC (Troncarelli et al., 2008).

Neste estudo, o elevado número de cães considerados suspeitos de estarem acometidos de LVC, os quais, no entanto, obtiveram resultados negativos nos testes diagnósticos utilizados, corrobora observações de outros autores. Este quadro pode ser justificado pelo fato de os sinais clínicos não serem patognômicos, o que significa que poderiam estar relacionados a outras enfermidades (Brasil, 2006; Faucher & Piarroux, 2010).

Com base na informação de que os cães com resultados positivos pela PCR, provenientes dos municípios de Caldas Novas e Novo Brasil, eram animais nascidos e mantidos permanentemente nos locais de origem, pôde-se concluir pela autoctonia destes casos nestes municípios. Este fato justifica a importância de estudos sobre a fauna flebotômica, de investigação epidemiológica e da implantação de estratégias de controle da LV nestas áreas.

O exame parasitológico direto é um método de elevada especificidade, porém, em virtude de sua menor sensibilidade, pode não identificar todos os animais portadores em determinada área. De acordo com Moreira et al. (2007), o linfonodo é o melhor órgão para coleta e diagnóstico pelo exame parasitológico direto. Entretanto, no presente estudo, as amostras provenientes de fragmentos de pele foram as que apresentaram o maior número de resultados positivos devidamente confirmados pela PCR. Estudos têm demonstrado que a PCR tem sido capaz de identificar parasitemias inferiores a um parasita por microlitro (Mary et al., 2006). Com a utilização de técnicas moleculares, torna-se maior a possibilidade de identificação de casos, já que a técnica oferece sensibilidade superior ao exame parasitológico direto. Além disso, trata-se de técnica menos invasiva comparada ao exame parasitológico para o qual é necessária a biópsia de fragmento de pele (Faucher & Piarroux, 2010). Alguns autores estimam que os casos assintomáticos representem 50% a 60% do total de animais infectados (Alvar et al., 2004). Esta informação reforça a

importância da utilização de novas técnicas que identifiquem reservatórios e vetores em programas de investigação epidemiológica (Kato et al., 2010).

CONCLUSÕES

Conclui-se que existe casuística de LVC em cães sintomáticos ou assintomáticos presentes na cidade de Goiânia, mas este município continua com o *status* de área “vulnerável” e “silenciosa”, pois os casos positivos encontrados não tiveram sua autoctonia confirmada.

O exame parasitológico direto e a PCR apresentam resultados equivalentes para o diagnóstico da LVC.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Dra. Rosângela Zacarias Machado, da UNESP-Jaboticabal, pelo apoio na realização dos testes sorológicos e pela disponibilização de reagentes, antígenos e soros de controle.

ABSTRACT

Studies on canine visceral leishmaniasis in the municipality of Goiânia, Goiás, Brazil.

Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonosis caused by *Leishmania infantum chagasi*. The canids play an important role in its epidemiology as they are natural reservoirs. The present study aimed to investigate canine VL (CVL) in dogs from the city of Goiania. A group of 214 dogs (symptomatic and asymptomatic) was assessed. Blood samples, skin biopsies and lymph node aspirates were collected from the animals. Twenty dogs were positive by immunofluorescence antibody test (IFAT) while only 6 presented amastigotes in the direct microscopic examination (DME). The PCR tests, employed only for symptomatic animals or for those classified as positive by at least one of the two previous methods (n=81), were positive for 7 dogs. Positive samples by the DME were also positive by PCR. Only 7 out of 20 IFAT positive samples were confirmed by PCR. Species-specific PCR results confirmed the molecular identity of *L. i. chagasi* in these 7 animals. Among the samples confirmed by PCR, two corresponded to the first autochthonous cases of CVL, in the municipalities of Caldas Novas and Novo Brazil, and emphasized the urgent need to enhance control strategies for CVL in these localities. The study revealed the existence of CVL cases in dogs attending veterinary clinics in the city of Goiania.

KEY WORDS: *Leishmania infantum chagasi*. Public health. Molecular diagnosis. Parasitologic examination. Urban reservoir. Immunofluorescence antibody test.

REFERÊNCIAS

1. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57: 1-87, 2004.
2. Amusatogui I, Sainz A, Rodríguez F, Tesouro MA. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur J Epidemiol* 18: 147-156, 2003.
3. Assis J, Queiroz NMGP, Silveira RC, Oliveira TMFS, Junior ACFN, Neves MF, Machado RZ, Buzetti WAS. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. *Rev Bras Parasitol Vet* 19: 17-25, 2010.
4. Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *The Vet J* 175: 14-15, 2008.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica em Saúde, *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Ed. MS, Brasília, DF, 2006.
6. Brasil, [on line] Disponível em: <http://www.saude.gov.br/index.php?idMateria=4754>, Acesso em: 10 de mai.2009.
7. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318, 2004.
8. Faucher B, Piarroux R. Actualités sur les leishmanioses viscérales. *Rev Med Interne* 2010. doi: 10.1016/j.revmed.2010.08.002.
9. Fichoux YL, Quaranta JF, Aufeuve JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, Rousseau D, Kubar J. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol* 37: 1.953-1.957, 1999.
10. Gomes AHS, Ferreira IMR, Lima MLSR, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MFL, Pereira-Chioccola VL. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 144: 234-241, 2007.
11. Gomes YM, Cavalcanti MP, Lira RA, Abath FGC, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *The Vet J* 175: 45-52, 2008.
12. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 7: 338-349, 2004.
13. Iniesta L, Fernandez-Barredo S, Bulle B, Gomez MT, Piarroux R, Gallego M, Alunda JM, Portus M. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 1.137-1.141, 2002.
14. Kato H, Gomez EA, Caceres AG, Uezato H, Mimori T, Hashiguchi Y. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. *Int J Environ Res Public Health* 7: 814-826, 2010. doi:10.3390/ijerph7030814.
15. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174, 1977.
16. Mary C, Faraut F, Drogoul MP, Xeridat B, Schleinitz N, Cuisenier B, Dumon H. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am J Trop Med Hyg* 75: 858-863, 2006.
17. Michalick MSM. O Gênero *Leishmania*. In: Neves DP, Melo AL, Linard PM, Vitor RWA. *Parasitologia humana*. 11ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p.41-46.
18. Moreira MAB, Luvizotto MCR, Garcia JF, Corbett CEP, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* 145: 245-252, 2007.
19. Moreno J, Avar J. Canine leishmaniasis epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18: 399-405, 2002.
20. Neves DP, Melo AL, Linard PM, Vitor RWA. *Parasitologia humana*. 11ª edição. São Paulo: Atheneu, 2005. p.494.

21. Oliveira TMF De S, Furuta PI, Carvalho D, Machado RZ. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania sp.*, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Rev Bras Parasitol Vet* 17: 7-11, 2008.
22. OMS - Organização Mundial De Saúde. Consulta de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas. Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas. *Organização Panamericana de la Salud*. Ed. Panaftosa. Rio de Janeiro, 2006. p.152.
23. Quaresma RF, Murta SMF, Ferreira EC, Rocha-Lima ACVM, Xavier AAP, Gantijo CMF. Molecular diagnosis of canine leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop* 111: 289-294, 2009.
24. Reithinger R, Espinoza JC, Courtenay O, Davies CR. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). *J Clin Microbiol* 41: 1.486-1.493, 2003.
25. Riera C, Fisa R, Udina M, Gallego M, Portus M. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 102-110, 2004.
26. Santos SO, Arias JR, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 12: 315-317, 1998.
27. Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 577-579, 2006.
28. Tolezano JE, Uliana SRB, Taniguchi HH, Araújo MFL, Barbosa JAR, Barbosa JER, Floeter-Winter LM, Shaw JJ. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs *Canis familiaris* diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 149: 280-284, 2007.
29. Thrusfield MV. *Veterinary epidemiology*, 2nd ed. Blackwell Science, Oxford, England. 1995. p.479.
30. Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitological status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg* 64: 119-124, 2001.
31. Troncarelli MZ, Machado JG, Camargo LB, Hoffmann JL, Camossi L, Greca H, Faccioli PY, Langoni H. Associação entre resultados sorológicos no diagnóstico da leishmaniose e de tripanossomiase canina, pela técnica de imunofluorescência indireta. *Vet Zootec* 15: 39-46, 2008.