



PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E COINFEÇÕES EM REGIÃO PERIURBANA NO DISTRITO FEDERAL – BRASIL

PREVALENCE OF VISCERAL CANINE LEISHMANIOSIS AND CO-INFECTIONS IN PERIURBAN REGION IN THE FEDERAL DISTRICT - BRAZIL

Cassio Ricardo Ribeiro¹ ORCID - <http://orcid.org/0000-0003-3250-6674>

Carolynne Arruda Gonçalves² ORCID - <http://orcid.org/0000-0002-0056-4442>

Lauricio Monteiro Cruz³ ORCID - <http://orcid.org/0000-0001-5150-5867>

Paula Diniz Galera^{2*} ORCID – <http://orcid.org/0000-0002-6496-2538>

¹Médico Veterinário Autônomo, Brasília, DF, Brasil.

²Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

³ Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde da Secretaria de Saúde do Distrito Federal, Brasília, DF, Brasil.

*Autora para contato - dra.paulagalera@gmail.com

Resumo

Objetivou-se verificar a prevalência da leishmaniose visceral canina (LVC) em área periurbana com foco de transmissão no Distrito Federal (DF) e também avaliar a prevalência de coinfeções como dirofilariose, anaplasmose, erliquiose e doença de Lyme em cães sororreagentes para LVC. Inicialmente, amostras de soros dos cães da área de estudo foram testadas à reação imunocromatográfica que contém dois antígenos recombinantes – rK39 e rK26 – (DPP) para *Leishmania* sp. O soro dos animais reagentes ao teste de DPP foi confirmado para LVC com ELISA. As amostras reagentes a ambos os testes foram analisadas para possíveis coinfeções através do teste de SNAP (IDEXX 4Dx Plus). Foram avaliados 240 cães, dos quais 132 (55%) obtiveram resultados reagentes para DPP e para ELISA concomitantemente, sendo diagnosticados com LVC. Destes, 26 (20%) foram reagentes para *Ehrlichia canis* ou *E. ewingii*, 9 (7%) apresentaram positividade para *Anaplasma phagocytophilum* ou *A. platys* e, nessas amostras que se apresentaram reagentes, observou-se a ocorrência de coinfeção de anaplasmose, erliquiose e leishmaniose em 3 (2,3%) animais. Verificou-se alta prevalência da LVC na região periurbana do DF, destacando-se a necessidade de diagnóstico mais preciso quanto a coinfeções que possivelmente podem influenciar no prognóstico e manifestação do quadro clínico desses pacientes.

Palavras-chave: coinfeções, leishmania, DPP, ELISA

Abstract

The aim of this study was to verify the prevalence of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) in periurban area focusing on transmissions that occurred on Distrito Federal (DF), and also, evaluate the prevalence of co-infections like dirofilariosis, anaplasmosis, ehrlichiosis and Lyme disease in dogs seroreagents to CLV. Initially the serum of the dogs inhabitants of the study area was tested according to the immunochromatographic reaction that contained two recombinant antigens - rK39 e rK26 - (DPP) to *Leishmania* sp. The animal plasma that reacted to the DPP test was confirmed for CVL with ELI-SA. Through confirmation of diagnose of VL by both tests, the samples were analyzed

for possible co-infections through SNAP test (IDEXX 4Dx Plus). 240 dogs were tested, 132 (55%) of which obtained reacting results for DPP and for ELISA concomitantly, being diagnosed with CVL. Amongst those, 26 (20%) were positive for *Ehrlichia canis* or *E. ewangii*, meanwhile 9 (7%) presented positive results for *Anaplasma phagocytophilum* or *A. platys*, from those samples that showed to be positive, co-infection of anaplasmosis, ehrlichiosis and leishmaniasis was observed in 3 (2.3%) dogs. The high prevalence of CVL was observed in the periurban region of DF, highlighting the need for more precise diagnosis regarding co-infections that may possibly influence on the prognosis and clinical manifestation of these patients.

Key words: co-infections, Leishmania, DPP, Elisa

Recebido em: 02 de outubro de 2017.

Aceito em: 07 de junho de 2018.

Introdução

A leishmaniose visceral é uma antroponose cosmopolita potencialmente fatal causada por protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes à família Trypanosomidae, gênero *Leishmania* spp^(1,2). No Brasil, a LV é causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi* – CUNHA & CHAGAS, 1937–, tendo como principal vetor os flebotômíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*^(2,3), comumente conhecidos como mosquito-palha. Essa doença é a forma de apresentação mais severa dentre as leishmanioses, que classicamente são divididas em Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT), sendo esta segunda forma de apresentação ocasionada, no Brasil, principalmente pelas espécies *Leishmania amazonensis* e *L. brasiliensis*⁽²⁾.

Para controlar a propagação de uma das doenças mais importantes da atualidade, principalmente em indivíduos imunossuprimidos, adotam-se medidas de controle preconizadas no Programa de Controle e Vigilância da Leishmaniose Visceral (PCVLV), que se baseia principalmente na eutanásia de cães sororreagentes, considerados os principais reservatórios urbanos do protozoário⁽²⁾. Isto porque têm íntima relação com o ser humano, bem como por serem altamente suscetíveis à infecção por *Leishmania chagasi* e representarem a principal fonte de infecção aos flebotômíneos por causa de parasitismo intenso na pele, independentemente da sua apresentação clínica^(2, 4, 5, 6); no entanto, a eutanásia desses animais é uma medida controversa⁽⁸⁾.

Até 2012, a leishmaniose visceral canina (LVC) era diagnosticada utilizando-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), um método recomendado para a confirmação de casos positivos detectados por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)⁽²⁾. Recentemente, para melhorar a acurácia no diagnóstico da LVC, o PCVLV recomenda a utilização de um teste rápido imunocromatográfico, compreendendo os antígenos recombinantes rK26 e rK39, o DPP (Dual-Path Platform; Bio-Manguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), para a triagem de cães infectados, e ELISA para confirmar os resultados positivos^(8,9).

A LV é uma doença endêmica principalmente em regiões tropicais e subtropicais e era registrada principalmente em áreas rurais^(2, 10). Entretanto, nas últimas décadas, a doença vem se urbanizando à medida que o vetor tem se adaptado melhor a esses ambientes devido ao desequilíbrio ecológico, refletindo num aumento da incidência de casos. Verifica-se, ainda, que em poucos países a notificação é compulsória, e muitos casos não são devidamente diagnosticados, fazendo com que a incidência

dessa doença seja subestimada⁽¹⁰⁾.

Nas últimas décadas, a LV tornou-se um importante problema de saúde pública no Brasil, afetando em torno de 3.400 pessoas por ano (estabilizado nesses valores anuais desde 2004), com uma taxa de incidência anual de 1,9 caso por 100.000 habitantes⁽²⁾.

No Distrito Federal, os primeiros dois casos fatais e autóctones diagnosticados de LV humana foram observados no final de 2005, no Condomínio Serra Azul, Sobradinho II (área periurbana)⁽²⁾. Outros 65 casos humanos foram diagnosticados no Distrito Federal (2005-2013), em regiões periurbanas invadidas e ocupadas às custas de desmatamentos. As condições socioeconômicas e ambientais, associadas aos hábitos de vida, são importantes fatores na epidemiologia da LV em áreas endêmicas, favorecendo sua perpetuação nas áreas rurais e periurbanas, acometendo habitantes de aglomerados urbanos com baixo nível socioeconômico, cujas famílias vivem em condições precárias^(2,11).

Objetivou-se, neste estudo, verificar a prevalência da LVC em área periurbana com foco de transmissão (Condomínio Entrelagos – DF) no Distrito Federal e, também, avaliar a prevalência de coinfeções como dirofilariose, anaplasmoze, erliquiose e doença de Lyme em cães sororreagentes para LVC.

Material e métodos

A região de escolha para o estudo foi uma área periurbana com foco de transmissão de leishmaniose visceral, onde foram confirmados dois casos de leishmaniose humana autóctone em 2015⁽¹²⁾. O Condomínio Entrelagos DF, situado na cidade-satélite de Sobradinho, no Distrito Federal, é delimitado pelas coordenadas -15°.7527438, -47°.7536566, e se encontra a 25 km de distância do Plano Piloto e a 22 km de distância da cidade de Sobradinho. O local conta com todas as ruas asfaltadas e se encontra próximo à estrada DF 250, estabelecendo limites com dois condomínios e o núcleo rural de Sobradinho. O Condomínio Entrelagos é uma região periurbana no Distrito Federal que possui 354 hectares e ocupa a área de uma antiga fazenda chamada Paranoá, localizada em região de alta altitude (entre 1138 e 1150 metros acima do nível do mar). Contida nesse condomínio, há uma reserva ecológica de 50 hectares que margeia o córrego Indaiá e abriga exemplares típicos da flora e da fauna da região do Cerrado. A região é dividida em quatro etapas, sendo que os lotes habitacionais têm no mínimo 1000m² e alta densidade populacional de cães, domiciliados ou não. A coleta de lixo é realizada duas vezes por semana.

Todos os 240 cães (*Canis familiaris* – LINNAEUS, 1758) domiciliados do Condomínio Entrelagos (DF) foram submetidos à coleta de sangue executada pelos agentes de saúde da Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde da Secretaria de Saúde do Distrito Federal, no período compreendido entre janeiro e dezembro de 2016. Previamente às coletas de sangue, foram obtidas informações com dados do tutor (nome, endereço) e do cão (raça, idade, gênero, entre outros).

As amostras de 3 a 5mL de sangue foram obtidas da veia jugular, utilizando-se agulhas 25×7mm e tubos Vacutainer® sem anticoagulante. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 800 G durante cinco minutos para obtenção de amostras de soro, que foram armazenadas em temperatura de -20°C até o momento das análises.

As amostras armazenadas foram utilizadas para a realização de exames diagnósticos para LVC, sendo inicialmente avaliadas pelo teste rápido de triagem, de maior sensibilidade, isto é, a reação imunocromatográfica que contém dois antígenos recombinantes – rK39 e rK26 – (DPP

– LVC– Bio-Manguinhos – FIOCRUZ – Rio de Janeiro – RJ) para *Leishmania* sp. As amostras de soro dos cães reagentes ao teste de DPP foram reprocessadas e reavaliadas para LVC com ELISA, visando à confirmação do diagnóstico (maior especificidade). Mediante confirmação diagnóstica a ambos os testes, realizou-se avaliação sorológica para outras doenças infecciosas através do teste de SNAP (IDEXX 4Dx Plus), como Dirofilariose [*D. immitis*], Anaplasmose [*Anaplasma phagocytophilum* ou *Anaplasma platys*], Erliquiose [*Ehrlichia canis* ou *Ehrlichia ewingii*] e Doença de Lyme [*Borrelia burgdorferi*] para se descartar coinfeções que potencialmente interferem no diagnóstico sorológico (falso-positivos).

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA-UnB), n. 31897/2016.

Resultados e discussão

Foram testados 240 cães domiciliados no Condomínio Entrelagos (Sobradinho-DF) entre janeiro e dezembro de 2016, sendo que 132 (55% - 132/240) cães obtiveram resultados reagentes para DPP e para ELISA e, portanto, com diagnóstico positivo para LVC. A alta soroprevalência desta região se aproxima à demonstrada em estudos semelhantes, que chegaram a 75,3% de positividade em cães em Anastácio (MS),⁽¹³⁾ enquanto outros estudos demonstraram prevalências entre 21% a 25% em cães de Jequié – BA⁽¹⁴⁾ e de São José do Ribamar – MA⁽¹⁵⁾.

Nas 132 amostras soropositivas para LVC, foram realizados testes para outras doenças infecciosas como dirofilariose, anaplasmose, erliquiose e doença de Lyme (SNAP- IDEXX 4Dx Plus) para se descartarem coinfeções que potencialmente interferem no diagnóstico sorológico (falso-positivos). Destas, 26 amostras (20% - 26/132) foram reagentes para *Ehrlichia canis* ou *Ehrlichia ewingii*, prevalência próxima ao relatado em um estudo no estado do Paraná, que verificou coinfeção em 23% dos cães com LV⁽¹⁶⁾. Um total de nove amostras (7% - 9/132) apresentou positividade para *Anaplasma phagocytophilum* ou *Anaplasma platys*. Coinfeção concomitante com anaplasmose, erliquiose e leishmaniose foi observada em 3 dos 132 (2,3% - 3/132) ensaios realizados.

Embora o método de maior especificidade para o diagnóstico de LV seja o exame parasitológico, nem sempre ele é de fácil execução, e sua sensibilidade é relativamente baixa. Portanto, a incorporação de um teste rápido (DPP) no protocolo atual do PCVLV para detecção de LVC acelerou a implementação das medidas de controle em áreas endêmicas. O DPP é um procedimento que não requer equipamentos e suprimentos especializados e utiliza pequenas amostras de sangue. Já do ponto de vista da saúde pública, os resultados positivos em testes sorológicos são utilizados como critério, de acordo com o PCVLV, para indicação de eutanásia em cães reagentes^(2, 17).

No entanto, esses testes sorológicos apresentam limitações importantes, como reações cruzadas – que permanecem controversas – com parasitas *Trypanosoma*, espécies de leishmaniose cutânea e outros hemoparasitas (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*), bem como resultados falso-negativos em casos de anergia ou baixos títulos (reações duvidosas)⁽¹⁸⁾. Ainda, estudos com o uso do método molecular (PCR) para detecção de *Leishmania chagasi* demonstraram ser essenciais para o diagnóstico acurado da LVC, especialmente em cães assintomáticos provenientes de áreas não endêmicas, nas quais os testes sorológicos não conseguiram acusar um número expressivo de animais infectados (19,6% - falso-negativos)^(17, 19).

Durante a vida, qualquer ser vivo é exposto a uma diversidade de parasitos de modo sequencial ou

simultâneo, sendo rara a situação na qual há somente um parasita atuando num mesmo organismo hospedeiro. Provavelmente coexistem infecções de diferentes espécies de parasitas, ou de grupos taxonômicos ou gêneros diferentes^(20, 21) e, dependendo da associação desses organismos, é notável sua competência em suprimir e/ou desviar a resposta imune do hospedeiro, com mecanismos tão diversos quanto os nichos que ocupam⁽²²⁾. As associações entre parasitos são complexas e dependem de variáveis pertencentes ao meio e ao hospedeiro, gerando diversas manifestações clínicas que podem imunossuprimir o hospedeiro e induzir à má nutrição, considerada a causa mais importante de imunodeficiência secundária e de alta prevalência de infecções e doenças⁽²³⁾.

A infecção dos cães pela *Leishmania chagasi*, *Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis* coexistem devido ao fato de a atividade de seus vetores e o período de transmissão serem semelhantes, como também pela abundância de artrópodes vetores e de cães nas áreas endêmicas^(24, 25, 26, 27). A ocorrência das espécies de *Leishmania* sp. é normalmente limitada à distribuição do vetor, que é determinada geograficamente. Os vetores pertencem à subfamília Phlebotominae, que se divide em dois gêneros principais: *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Na Europa, na Ásia e na África (Velho Mundo), os vetores das espécies causadoras das leishmanioses visceral e cutânea são do gênero *Phlebotomus*⁽²⁸⁾ e, no Brasil, são do gênero *Lutzomyia*⁽²⁾.

A mudança no contexto da doença, que tem se tornado cada vez mais cosmopolita, é fato bastante conhecido. A devastação de grandes áreas silvestres para exploração econômica traz a doença para a periferia dos centros urbanos, sendo que tanto os vetores como os hospedeiros, nos casos silvestres, são obrigados a migrarem para o peridomicílio humano em busca de alimentos, transmitindo ao mesmo tempo os agentes da doença. A presença de animais domésticos e silvestres no peridomicílio atrai um grande número de flebotomíneos, aumentando o risco de transmissão da *Leishmania* sp.⁽²⁹⁾.

O Condomínio Entrelagos é uma região periurbana no Distrito Federal, no qual se encontra uma reserva ecológica constituída por exemplares da fauna do Cerrado e alta densidade populacional de cães com e sem tutores, justificando a alta incidência de animais soropositivos para LVC. A doença é caracterizada como endêmica em regiões periurbanas associadas ao desmatamento, acometendo cães e animais silvestres como reservatórios, principalmente as raposas (*Dusicyon vetulus*), os cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e os marsupiais (gambás – *Didelphis albiventris*)⁽³⁰⁾. A LVC é uma doença sistêmica severa cujas manifestações clínicas são intrinsecamente dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado, sendo que o próprio parasito é capaz de causar e perpetuar essa imunossupressão permitindo sua disseminação para muitos órgãos, com agravamento do quadro clínico do paciente^(2, 18, 26, 27).

Os cães são considerados os principais reservatórios do protozoário no âmbito doméstico devido ao elevado parasitismo cutâneo que esse animal consegue apresentar, facilitando a contaminação do vetor, que já tem natural atração para esse vertebrado de sangue quente⁽³¹⁾. A justificativa da erradicação do cão positivo para LVC baseia-se, principalmente, no contato íntimo do cão com o ser humano, já que casos de LVC antecedem os casos em seres humanos nas áreas urbanas do Brasil⁽³²⁾ e, mesmo apesar de a frequência de infecção de ambos apresentar diferenças, o parasita dos dois hospedeiros é o mesmo. Entretanto, a eutanásia de animais positivos é vista como equivocada por muitos estudiosos para o combate à disseminação da doença, pois, além de apresentar diagnósticos que não são suficientemente acurados para essa conduta^(10, 18, 19), principalmente pela baixa sensibilidade dos métodos sorológicos utilizados^(7, 18, 19), a literatura reporta o pouco impacto dessa prática sobre a redução de casos humanos e caninos^(33, 34, 35).

Conclusão

No presente estudo, foi observada importante prevalência de animais sororreagentes para LVC em região periurbana do Distrito Federal, muitos dos quais cursando com coinfeções concomitantes, com destaque para a erliquiose. Verifica-se a necessidade de diagnóstico mais preciso quanto a coinfeções com a LVC que podem influenciar no prognóstico e no quadro clínico desses pacientes.

Agradecimentos

À Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde (DIVAL/SES/DF) do Distrito Federal e ao CNPq, edital PIBIC.

Referências

1. Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). *Clínica Veterinária*. 2000, 15(28):36-44.
2. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Depto. de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, 2014. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_ledicao.pdf
3. Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*. 2004, 57: 1-88. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)57001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X)
4. Molina R, Amela C, Nieto J, Sandres M, Gonzalez F, Castillo JA, et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994, 88: 491–493. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90446-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90446-4).
5. Guiunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, et al. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *Journal of Comparative Pathology*. 2006,135:100-107. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcpha.2006.06.005>
6. Michalsky EM, Rocha MF, Da Rocha Lima AC, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Veterinary Parasitology*. 2007,147: 67–76. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.004>
7. Romero GAS, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 2010, 4(1):e584. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584>
8. Brasil. Ministério da Saúde. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina; Nota técnica conjunta nu 01/2011 - CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. 2011.
9. Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Leal GG, Moreira ND, et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *PLoS ONE*. 2014, 9(3): e91009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091009>
10. Faria AR, De Andrade HM. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática; *Rev Pan-Amaz Saúde* 2012. p.47. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232012000200007>

11. Coutinho MT, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2005, 128(1-2):149-155. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.011>
12. Secretaria de Estado de Saúde. Informativo Epidemiológico das Leishmanioses no Distrito Federal. Gerência de Doenças Crônicas e Outros Agravos Transmissíveis (GEDCAT). Subsecretaria de vigilância à saúde. Secretaria de Estado de Saúde. Governo do Distrito Federal. 2016. 8p. Disponível em: http://www.saude.df.gov.br/images/Informativos/2016/Informativo_Epidemiologico_das_Leishmanioses_no_DF__1_2016.pdf
13. Cortada VMCL, Doval MEC, Souza-Lima MAA, Oshiro ET, Neneses CRV, Abreu-Silva AL, et al. Canine visceral leishmaniasis in Anastácio, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Research Communications*. 2004, 28(5): 365-374. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/B:VERC.0000035014.80785.b7>
14. Paranhos-Silva M, Freitas LAR, Santos WC, Grimaldi GJ, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*. 1996, 55(1): 39-44. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.55.39>
15. Guimarães KS, Batista ZS, Dias EL, Guerra RMSNC, Costa ADC, Oliveira AS, et al. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2005, 131(3-4): 305-309. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.008>
16. Trapp SM, Dagnone AS, Vidotto O, Freire RL, Morais HSA. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Veterinary Parasitology*. 2006, 140(3-4): 223-230. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.030>
17. Lopes EG, Sevá AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB, Hiramoto RM, et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. *Epidemiology & Infection*. 2017, 145(12):2436-2444. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0950268817001443>
18. Zanette MF, Lima VMF, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RFC, et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2014, 47(1). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-1723-2013>
19. Riboldi E, Carvalho F, Roosevelt P, Romão T, Barcellos RB, Bello GL, et al. Molecular method confirms canine leishmania infection detected by serological methods in non-endemic area of Brazil. *Korean J Parasitol*. 2018, 56(1):11-19. Disponível em: <https://doi.org/10.3347/kjp.2018.56.1.11>
20. Cox FEG. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology*. 2001, 122: S23-38. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S003118200001698X>
21. McKay DM. The beneficial helminth parasite? *Parasitology*. 2006, 132:1–12. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S003118200500884X>
22. Pfaff AW, Candolfi E. Immune responses to protozoan parasites and its relevance to diagnosis in immunocompromised patients. *European Journal of Protistology*. 2003, 39: 428-34. Disponível em: <https://doi.org/10.1078/0932-4739-00016>
23. Lloyd, S. (1995). Environmental Influences on Host Immunity. In B. Grenfell & A. Dobson (Eds.), *Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations* (Publications of the Newton Institute, pp. 327-361). Cambridge: Cambridge University Press. Chapter DOI: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511629396.013>
24. Grooves MG, Dennis GL, Amyx HL, Huxsoll DL. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *American Journal of Veterinary Research*, 1975, 36(7): 937-940.

25. Inokuma H, Raoult D, Brouqui P. Detection of Ehrlichia platys DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000, 38(11): 4219-4221. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/38/11/4219.full>
26. Mekuzas Y, Gradoni L, Oliva G, Foglia Manzillo V, Baneth G. *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. *Journal Compilation 2009 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15 (Suppl. 2):30–31. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02150.x>
27. Souza KCM. Co-infecções por *Ehrlichia canis*, *Leishmania chagasi* e *Babesia canis* em cães naturalmente infectados em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2012. Disponível em: http://200.145.6.238/bitstream/handle/11449/96002/sousa_kcm_mejabo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
28. Greene C. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis and Wolbachia Infection. In: Greene C. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3rd ed. St. Louis: Saunders; 2006. p. 203 -231.
29. Barata AR, França-Silva CJ, Mayrink W, Da Silva CJ, Prata A, Loroza SE, et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotômicos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2005, 38(5):421-425. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822005000500012>
30. Santiago MEB, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari DP, Michelin AF, Lima VMF. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and periurban areas in Bauru (Sao Paulo, Brazil). *Veterinary Parasitology*. 2007, 150: 283-290. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.026>
31. Mathis A, Deplazes P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995, 33(5):1145-1149. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228120/pdf/331145.pdf>
32. Herenio ME, Fortes RC, Rincon G. Prevalência da Leishmaniose visceral em cães do Distrito Federal, segundo dados do centro de zoonoses de Brasília. *J Health Sci Inst*. 2014. 32(2):126-9. Disponível em: https://www.unip.br/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2014/02_abr-jun/V32_n2_2014_p126a129.pdf
33. Courtenay O, Quinzel RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *Journal of Infectious Disease*. 2002, 186 (9): 1314-1320. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/344312>
34. Costa Ch. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011, 44(2):232-242. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011005000014>
35. Grimaldi G, JR., Teva A, Santos CB, Ferreira AL, Falqueto A. The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012, 86(6): 966–971. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0040>