



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ADAM LEAL LIMA

LEISHMANIOSE E ERLIQUIOSE CANINA: UMA ABORDAGEM
EPIDEMIOLÓGICA E CLÍNICO-LABORATORIAL

FORTALEZA – CEARÁ

2021

ADAM LEAL LIMA

LEISHMANIOSE E ERLIQUIOSE CANINA: UMA ABORDAGEM EPIDEMIOLÓGICA E
CLÍNICO-LABORATORIAL

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Sanidade Animal.

Orientadora: Prof. Dra. Diana Célia Sousa
Nunes Pinheiro

FORTALEZA – CEARÁ

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Lima, Adam Leal.

Leishmaniose e erliquiose canina: uma abordagem epidemiológica e clínico-laboratorial [recurso eletrônico] / Adam Leal Lima. - 2021. 127 f. : il.

Tese (DOUTORADO ACADÊMICO) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Programa de Pós-graduação Em Ciências Veterinárias - Doutorado, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof.e Dra. Diana Celia Sousa Nunes Pinheiro.

1. Saúde Única. 2. Leishmaniose visceral canina. 3. Erliquiose canina. 4. Fatores de risco. 5. Estrato Social. 6. Comorbidades. 7. Diagnóstico. 8. Tratamento. I. Título.

ADAM LEAL LIMA

LEISHMANIOSE E ERLIQUIOSE CANINA: UMA ABORDAGEM EPIDEMIOLÓGICA E
CLÍNICO-LABORATORIAL

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Sanidade Animal.

Aprovada em: 29 de outubro de 2021.

BANCA EXAMINADORA:



Doutora Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro
Orientadora



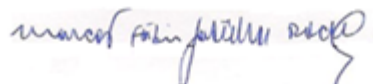
Doutora Claudia Maria Leal Bevilaqua
Examinadora



Doutor Wesley Lyeverton Correia Ribeiro
Examinador



Doutor Carlos Henrique Alencar
Examinador



Doutor Marcos Fábio Gadelha Rocha
Examinador



Doutor Bruno Marques Teixeira
Examinador

AGRADECIMENTOS

Primariamente a Deus, por suas obras e presença constante em minha vida.

À Universidade Estadual do Ceará por ter me dado a oportunidade de desenvolver meus conhecimentos na minha área de afinidade, contribuindo para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Fortaleza, pela colaboração nas coletas de campo e parceria irrestrita, confiável e em prol da saúde única.

À minha querida orientadora Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro, que aceitou esse desafio de me orientar em um projeto bastante ousado, com bastante paciência em aguentar minhas quedas, e determinação em manter meu foco me guiando para defender esta tese.

Aos Professores doutores Filipe Dantas Torres e Christine Anne Petersen, por todo o apoio científico e orientação sempre de coração aberto.

Às cientistas AngelaToepp e Marie Ozanne por tantas reuniões para discutir os dados e as análises possíveis, além da troca de experiências.

Às famílias de cães que permitiram a coleta de material acreditando em um fim científico com benefícios para a sociedade.

Ao meu pai, Aldo Ângelo Moreira Lima, meu grande ídolo e exemplo de profissional, professor, médico, pai, marido e amigo.

Ao meu filho Abraão Leal Silva Lima, que veio trazer energia e motivação a nossa casa.

Às minhas cadelas, Naty, Kyra, Mel, Eva, Cacau, Lunae Minie por me serem grandes motivadoras de eu ter me tornado veterinário e me proporcionam grandes momentos de descontração, e àqueles cães que se tornaram meus amigos: Petrus, Rei, Ringo, Mel, Kira entre outros.

À minha esposa Vanessa da Silva Lima por dividir nossos compromissos de casa e trabalho.

À minha mãe, Noélia Leal Lima, que me educou e me forneceu amor e carinho em todas as fases da minha vida, sendo sempre presente, nunca me deixando desviar dos caminhos corretos.

À minha irmã, Bruna Leal Lima Maciel, por ser um modelo de dedicação e contribuir com grandes conversas na minha pesquisa.

Ao meu irmão, Breno Leal Lima, por seu meu grande amigo e parceiro leal.

Aos meus colegas de laboratório e de profissão, por tantas confidências e apoio durante esses quatro anos, Társsila Mara Vieira, Thaíse Sombra, Tiago Cunha, Reginaldo Pereira, Luana Oliveira, Berlamino Neto, Claudio Carneiro, Pedro Covas e Ivan Leal.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para eu chegar aonde eu cheguei hoje: amigos, familiares, professores, colegas e conhecidos, o meu muito obrigado.

“Quando protegemos um, estamos
ajudando a proteger todos.”

(Autor desconhecido).

RESUMO

O íntimo contato e a domesticação tornou os cães a espécie com maior número de doenças semelhantes aos humanos. A leishmaniose visceral (LV) causada por protozoários *Leishmania infantum* é uma doença negligenciada com letalidade próximo a 10%. No Brasil, o ciclo da LV é zoonótico e os cães são reservatórios urbanos. Casos de leishmaniose visceral canina (LVC) são constantes nos centros urbanos brasileiros e os índices epidemiológicos de LV estão correlacionados com os de LVC. Medidas de prevenção e controle são realizadas para prevenir e controlar a LV além de eutanásia de reservatórios positivos. A erliquiose canina (EC) é uma doença causada por bactérias do gênero *Ehrlichia*, potencialmente fatal e zoonótica. Essas duas doenças são observadas frequentemente em comorbidade nos cães. Este trabalho visa abordar três situações: a) definir fatores de risco para LVC em área endêmica no Brasil. b) avaliar métodos de diagnóstico para EC na clínica veterinária; e c) relatar um caso de comorbidade LVC, EC e dirofilariose. O estudo transversal analítico foi realizado com 654 cães, destes 521 foram incluídos no modelo de regressão logística múltipla incluindo as seguintes variáveis: sexo, idade, tamanho, positividade para EC, estrato social (ES: 1 a 7), local que dorme, comprimento e cor da pelagem. A análise de regressão logística mostrou que cães de estrato social menos favorecido (OD: 1.39, IC 95%: 1.15 - 1.70, $p < 0,001$), positivos para erliquiose (OD: 2.01, IC 95%: 1.20 - 3.44, $p < 0,01$), que dormem no quintal (OD: 2.32, IC 95%: 1.44 - 3.79, $p < 0,01$) e que cães de grande porte (OD: 1.82, IC 95%: 1.03 - 3.15, $p < 0,05$) tem mais chances de serem positivos para LVC. O segundo trabalho avaliou 52 cães por quatro métodos de diagnóstico para EC comparados pelo modelo de Análise de Classe Latente: citologia de medula óssea (BMC), contagem de plaquetas (PC), teste rápido imunocromatográfico Alere® (Alere) e PCR de sangue periférico (PCR). BMC e PCR apresentaram sensibilidade de 100%, e especificidade de 100% e 64%, respectivamente, enquanto PC teve uma performance baixa, com sensibilidade de 63% e especificidade de 75%. Alere obteve performance moderada com sensibilidade de 81% e especificidade de 78%. A concordância dos testes foi calculada pelo coeficiente de kappa, sendo considerada razoável (0,38). Concluiu-se que o diagnóstico para EC exige uma anamnese detalhada somada ao exame físico para determinar a combinação certa de métodos de diagnóstico aplicada. No relato de caso, um cão foi diagnosticado com LVC, EC e dirofilariose em um check-up que permitiu a detecção precoce das comorbidades. Um protocolo terapêutico foi estabelecido, e após 12 meses de tratamento o animal obteve alta clínica com exames negativos. Concluiu-se que EC, estrato social familiar, o local onde o cão dorme e o tamanho do animal são fatores de

risco para LVC. Esses fatores podem ser evitados com medidas simples somados à visita veterinária preventiva periódica que permite a detecção dessas comorbidades precocemente promovendo a saúde única, ou seja, a vida dos cães e das famílias multiespécie.

Palavras-chave: Saúde Única. Leishmaniose visceral canina. Erliquiose canina. Fatores de risco. Estrato social. Comorbidades; Diagnóstico. Tratamento.

ABSTRACT

The close contact and antique domestication of dogs make them the species with the higher number of diseases like humans. In this context, visceral leishmaniasis (LV), caused by *Leishmania infantum* protozoans, is a neglected disease with high lethality rate when untreated. In Brazil, LV cycle is zoonotic, and dogs are considered one urban reservoir. Canine visceral leishmaniasis cases (LVC) are constantly found in Brazilian urban regions and epidemiological rates of LV and LVC are correlated. Several studies and measures are done to prevent and control LV, including positive reservoir control by euthanasia. Additionally, canine ehrlichiosis (EC) is an infectious disease caused by *Ehrlichia* genus bacteria, potentially fatal and zoonotic. These two diseases are frequently observed in comorbidity, worsening clinical signs, treatment, and prognosis. This work aims three situations: a) describe risk factors for LVC in endemic area of Brazil; b) evaluate diagnostic methods for EC in the veterinary clinic; and c) to report one case of LVC, EC and heartworm comorbidity. In the first study, a cross-sectional study was performed with 654 dogs. From those, 521 were included in the multiple logistic regression model with LVC as the outcome and including the following variables: sex, age, size, EC positivity, families' social stratum (ES: 1 to 7), sleeping location, fur length and color. Our results showed that on dog positive for ehrlichiosis (OD: 2.01, IC 95%: 1.20 - 3.44, $p < 0,01$), from lower social stratum (OD: 1.39, IC 95%: 1.15 - 1.70, $p < 0,001$), that sleep outside the house (OD: 2.32, IC 95%: 1.44 - 3.79, $p < 0,01$), and large dogs (OD: 1.82, IC 95%: 1.03 - 3.15, $p < 0,05$) have more chances to be seropositive for LVC. The second work tested 52 dogs by four diagnostic methods for EC compared by Latent Class Analysis model: bone marrow cytology (BMC), platelet count (PC), rapid immunochromatographic Alere® test (Alere) and total blood PCR (PCR). BMC and PCR had 100% sensibility, and 100%, 64% specificity respectively, meanwhile PC had low sensibility of 63% and specificity of 75%. Alere had moderate sensibility of 81% and specificity of 78%. Agreement between tests were calculated fair by kappa's coefficient (0,38). The case report consists of one dog diagnosed with heart worm, LVC and EC back in 2014 during annual check-up by veterinary practitioner. One therapeutic protocol was established and after 12 months of treatment, the animal was discharged from the clinic with negative tests. It was concluded that EC, family social strata, the place where the dog sleeps and the animal's size are risk factors for LVC. These factors can be avoided with simple measures, additionally, the periodic preventive veterinary visit allows the early detection of

these comorbidities, promoting One Health, which is, the lives of dogs and multispecies families.

Keywords: One Health. Canine visceral leishmaniosis. Canine ehrlichiosis. Risk factors. Social stratum. Comorbidities. Diagnostic. Treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação das principais espécies de <i>Leishmania</i> patogênicas. As espécies em negrito são endêmicas no Brasil 21
Figura 2	Ciclo biológico de <i>L. infantum</i> 25
Figura 3	Métodos de diagnóstico para LVC e as principais características.....30
Figura 4	Fluxograma de qual método utilizar para diagnóstico da LVC.....32
Figura 5	Tríade epidemiológica das leishmanioses visceral humana e canina.....35
Figura 6	O cão infectado por <i>L. infantum</i> pode ser observado de três formas distintas no mesmo cenário..... 37
Figura 7	Ciclo biológico de carrapato de três hospedeiros..... 39
Figura 8	Patogênia da erliquiose canina por <i>E. canis</i> 40
Figura 9	Sinais clínicos nas apresentações aguda, subclínica e crônica da erliquiose canina..... 41
Figura 10	Citologia de medula óssea com monócito infectado por uma mórula de <i>Ehrlichia</i> spp..... 43
Figura 11	Teste rápido para erliquiose canina Alere®.....43
Figura 12	Teste rápido para erliquiose canina, dirofilariose, anaplasmoses e borreliose IDEXX® Snap 4Dx.....44
Figura 13	Diagrama de como proceder para diagnosticar erliquiose canina.....44

CAPÍTULO II

Figure 1	Alluvial diagrams of canine monocytic ehrlichiosis (CME) diagnostic tests positivity and negativity related to diseased calculated by latent class analysis (LCA).....74
Figure 2	Flowchart suggesting how to conduct clinical diagnostic of canine monocytic ehrlichiosis (CME).....76

CAPÍTULO III

Figure 1	Picture from the dog in August 2014 showing hyperemic mucous membranes and mild alopecia..... 84
Figure 2	Picture from the dog in December 2017 showing wellness..... 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina no Brasil.....	22
Tabela 2	Estadiamento clínico, manejo e tratamento da leishmaniose canina baseado na sorologia, sinais clínicos e achados laboratoriais.....	34
CAPÍTULO I		
Table 1	Demographics of canine cross-sectional population.....	58
Table 2	Canine visceral leishmaniosis test results agreement.....	59
Table 3	Multivariate adjusted logistic regression model for odds ratio, confidence interval (C.I.), coefficient, standard error (Std. Error), and z value.....	59
CAPÍTULO II		
Table 1	Bone marrow cytology (BMC), imunochromatographic <i>Ehrlichia canis</i> Alere® test (Alere), platelet count (PC) and polymerase chain reaction (PCR).....	73
Table 2	Sensitivity and specificity for bone marrow cytology (BMC), imunochromatographic <i>Ehrlichia canis</i> Alere® test (Alere), platelet count (PC) and Polymerase Chain Reaction (PCR) calculated by latent class analysis.....	73
Table 3	Agreement between canine monocytic ehrlichiosis tests: bone marrow cytology (BMC), imunochromatographic <i>Ehrlichia canis</i> Alere® test (Alere), platelet count (PC) and polymerase chain reaction (PCR) calculated by Kappa agreement.....	75
CAPÍTULO III		
Table 1	Hematological and serological exams from 2013-2018 of a dog with canine leishmaniosis, heart worm and ehrlichiosis comorbidity.....	85
Table 2	Parasitological, serological, and molecular tests from 2013-2018 of a dog with canine leishmaniosis, heart worm and ehrlichiosis comorbidity.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

ABEP	Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa
AIC	Aikake Information Criterion
CanL	<i>canine leishmaniasis</i>
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CI	<i>confidence interval</i>
CME	<i>canine monocytic ehrlichiosis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP®	dual path platform
EC	Erliquiose canina
ELISA	Reação de imuno-absorbância enzimática
Ig	Imunoglobulinas
IFN	Interferon
INF	Interferon
LC	Leishmaniose cutânea
LIBA	Laboratório de imunologia e bioquímica animal
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
NET	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
OD	<i>Odds ratio</i>
PCLV	Programa de controle da leishmaniose visceral
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RR	relativerisk
UECE	Universidade Estadual do Ceará
VL	human visceral leishmaniasis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Relação homem-cão.....	18
2.2	Doenças transmitidas por vetores artrópodes caninas no Brasil.....	19
2.2.1	<i>Leishmaniose visceral canina</i>	20
2.2.1.1	Epidemiologia LV e LVC.....	21
2.2.1.2	Ciclo de vida de <i>L. Infantum</i>	23
2.2.1.3	Imunopatogenia da LVC.....	26
2.2.1.4	Diagnóstico da LVC.....	28
2.2.1.5	Tratamento da LVC.....	32
2.2.1.6	Prevenção da LVC.....	34
2.2.2	<i>Erliquiose Canina (EC)</i>	37
2.2.2.1	Epidemiologia da EC.....	38
2.2.2.2	Ciclo biológico da EC.....	38
2.2.2.3	Imunopatogenia da EC.....	40
2.2.2.4	Diagnóstico da EC.....	42
2.2.2.5	Tratamento da EC.....	45
2.2.2.6	Prevenção da EC.....	45
3	JUSTIFICATIVA.....	46
4	HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	47
5	OBJETIVOS.....	48
5.1	Objetivo geral.....	48
5.2	Objetivos específicos.....	48
6	CAPÍTULO I – Risk factors associated with <i>Leishmania</i> Seropositivity in Fortaleza city, Brazil: environmental, social, <i>Ehrlichia</i> exposure and dog characteristic.....	49
7	CAPÍTULO II – Diagnosis of canine ehrlichiosis in the day-to-day of the veterinary clinic.....	66
8	CAPÍTULO III – Successful treatment and management of canine ehrlichiosis- leishmaniosis-heart worm comorbidity.....	81
9	CONCLUSÕES.....	96

10	PERSPECTIVAS.....	97
	REFERÊNCIAS.....	98
	APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO SOCIODEMOGRÁFICO E EPIDEMIOLÓGICO LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA 2018/19.....	109
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	111
	ANEXO B – CERTIFICADO DO PROJETO DE PESQUISA.....	114

1 INTRODUÇÃO

O cão (*Canis familiaris*) é a espécie mais antiga domesticada e considerada o melhor amigo do homem. Essa relação duplamente benéfica tem início há 16-35 mil anos atrás na domesticação do lobo (*Canislupus*) antes mesmos dos humanos se tornarem cultivadores. De fato, os cachorros apresentam o maior número de doenças e síndromes semelhantes ao homem e podem desempenhar diversas funções, desde membro da família, guias de cegos, farejadores de drogas, resgate, diagnóstico de doenças, cobaias, guarda, cinoterapia e hospedeiro reservatório de doenças infecciosas (ZELLER; GOTTER, 2019).

Atualmente os cães têm íntima relação de amizade, amor e doenças conosco humanos, sendo o bicho de estimação número um no mundo. O Brasil é endêmico para diversas doenças caninas transmitidas por vetores artrópodes e a população de cães é de aproximadamente 54 milhões (2018), número que está em crescimento. Dentre essas doenças temos a leishmaniose visceral, erliquiose, dirofilariose, babesiose, anaplasmosse e hepatozoonose (WILLI et al., 2017).

Doenças transmitidas por artrópodes são mais abundantes em climas tropicais que favorecem o ciclo do vetor, como carrapatos, mosquitos, pulgas ou flebotomíneos. Seus agentes etiológicos incluem bactérias, protozoários ou nematóides (OTRANTO; DANTAS-TORRES; BREITSCHWERDT, 2009). Cada doença desenvolve seu ciclo através dos anos com adaptação do patógeno ao vetor e ao hospedeiro final. A literatura descreve uma capacidade do agente etiológico de manipular o sistema imune do hospedeiro a fim de garantir sua permanência, replicação e infestação de novos vetores. O vetor biológico nessas doenças tem de ser capaz de permitir a replicação do agente infeccioso ou no mínimo a transmissão da forma infectante (AKHOUNDI et al., 2016; ROQUE; JANSEN, 2014). Outros trabalhos já descrevem o efeito deletério da comorbidade de doenças transmitidas por vetores em um cachorro, agravando seu quadro clínico e complicando o diagnóstico e tratamento (TOEPP et al., 2019b). Dentre essas doenças, podemos citar a leishmaniose visceral (LV) causada por *L. infantum* no Brasil, que tem a soro prevalência canina associada a casos humanos em centros urbanos (FREITAS et al., 2013). Uma das medidas de controle para LV é o monitoramento e eutanásia de casos caninos, considerados reservatórios (ZUBEN; DONALÍSIO, 2016). Apesar da percepção da população do cachorro como membro da família, as medidas de prevenção direcionadas ao animal são escassas ou individuais, não considerando a saúde única (DANTAS-TORRES et al., 2019).

Adicionalmente à LV, a erliquiose canina (EC) é uma doença transmitida por carrapatos que está associada com leishmaniose visceral canina (LVC), sendo comumente classificada como fator de risco ou relacionada à piora dos sinais clínicos, diagnóstico, prognóstico e tratamento. Logo, a prevenção de EC deve ser considerada em um plano de saúde familiar unificado (TOEPP et al., 2019b).

A Saúde única é um conceito moderno que considera a saúde humana diretamente relacionada à saúde do ambiente em que vive, incluindo os animais que coabitam no mesmo ambiente (ZINSSTAG et al., 2011). Diversos estudos provaram essa ideia e novos trabalhos no controle e prevenção de doenças que incluam a saúde única estão sendo realizados. A pandemia de COVID-19 é mais um exemplo onde a saúde humana é diretamente afetada pela saúde dos animais que convivem no mesmo ambiente (MALLAPATY, 2021).

Logo, estudos epidemiológicos com doenças endêmicas de cães no Brasil, zoonóticas ou não, são importantes para implementar medidas de prevenção em Saúde Única, de forma a evitar não somente a doença em humanos, mas reduzir a carga patogênica no ambiente e desfavorecer a transmissibilidade ou surgimento de novas patogenias. Neste trabalho iremos relatar um caso de um cachorro com comorbidade de LVC, EC e dirofilariose, avaliar os métodos de diagnóstico clínico de EC e descrever os fatores de risco em uma população de cães de Fortaleza-CE, grande centro urbano endêmico para LVC e EC no Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Relação homem-cão

O termo domesticação pode ser definido como o processo pelo qual uma população de animais se torna adaptada aos humanos e ao convívio em cativeiro por meio de modificações genéticas induzidas por eventos de desenvolvimento ambientais ao longo de gerações (PRICE, 1984). Os cães (*Canis lupus familiaris*) são de longe a primeira espécie domesticada a partir do lobo cinzento (*Canis lupus*) com a data do primeiro cão domesticado entre 100 a 15 mil anos atrás. Essa relação iniciou antes mesmo do início do cultivo de plantas entre 12-10 mil anos atrás, logo se vê de onde vem a expressão “o cão é o melhor amigo do homem” (OSTRANDER et al., 2017; WAYNE; OSTRANDER, 2007).

Como ocorreu a domesticação permanece objeto de estudo, no entanto, acredita-se que houve uma soma de benefícios para ambas as espécies. A primeira vantagem emotiva

sugere que humanos ancestrais adotavam lobos mansos para convívio entre os humanos. Os humanos são considerados uma espécie com vontade de ajudar os indivíduos fracos, sendo talvez uma das características mais ressaltadas de nossa espécie e isso parece ter um peso recompensador no indivíduo que ajuda o próximo. Outra vantagem seria para os lobos na mudança de nicho alimentar, onde ao invés de caçarem por horas, poderiam seguir tribos humanas para se alimentar dos restos de suas presas. Essa segunda vantagem reforça a primeira, já que lobos com características mais dóceis poderiam se aproximar e se alimentar antes de outros lobos menos dispostos a socializar com humanos. Esse comportamento de mudança de nicho alimentar depende de mudanças genéticas entre o ancestral lobo e os primeiros cães, já que as sobras humanas são bem mais diversificadas que o cardápio carnívoro dos lobos. Além da mudança do nicho alimentar, houve também mudança no tipo de sociedade em que vivem. Lobos vivem em matilhas em que os líderes são um casal reprodutor e o restante dos indivíduos vive em função da procriação desse casal e cuidados com as crias. Por outro lado, cães livres vivem em sociedades diversas, que dependem da disponibilidade de comida e são bem mais promíscuos entre si do que seus ancestrais lobos (MARSHALL-PESCINI et al., 2017).

Independentemente de como ocorreu a domesticação e se isso foi benéfico ou não, os cães são hoje uma espécie de íntimo convívio com humanos mostrando o maior catálogo de doenças comuns à humanos do que qualquer outra espécie doméstica ou de laboratório (WAYNE; OSTRANDER, 2007), sendo a espécie criada como animal de estimação (*Pet*) número 1 no mundo. Essa relação promove diversos benefícios aos homens, entre eles saúde física e bem-estar psicológico (O'HAIRE, 2010), mas também torna os cães grandes vilões quando são espécie reservatório de doenças zoonóticas (BERMUDI et al., 2020).

2.2 Doenças caninas transmitidas por vetores artrópodes no Brasil

Dentre essas doenças zoonóticas, há algumas transmitidas por vetores artrópodes (DTVA), dentre elas a leishmaniose visceral (LV) e a erliquiose. A LV é causada por *L. donnovani* ou *Leishmania infantum* (Figura 1), mas somente a última é endêmica no Brasil (AZEVEDO et al., 2020).

As erliquioses são doenças causadas por bactérias do gênero *Ehrlichiae* transmitidas por carrapatos (THIRUMALAPURA; WALKER, 2015). No Brasil a Erliquiose Canina (EC) é endêmica, causada por infecção de *E. canis* e transmitida pelo carrapato

marrom do cão *Rhipicephalus sanguineus*. Seu potencial zoonótico é discutível, no entanto outras espécies de *Ehrlichia* são patogênicas para humanos (NEVES et al., 2014).

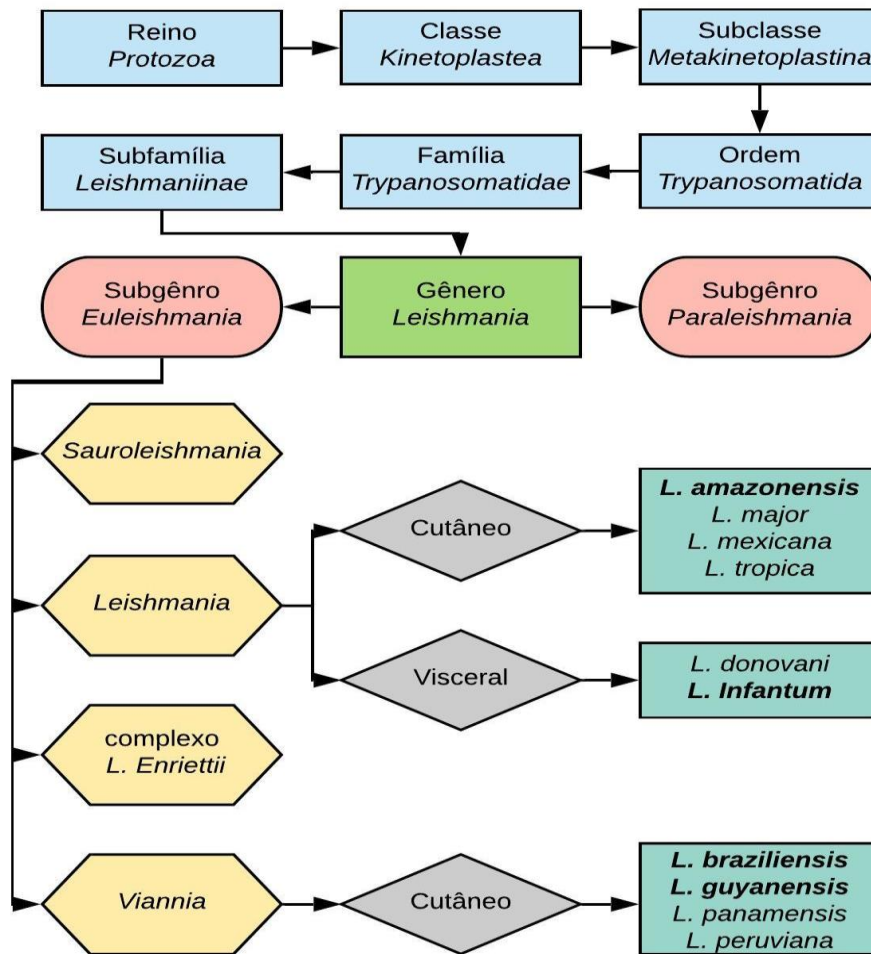
Os helmintos filarioides *Dirofilaria immitis* parasitam tipicamente cães, mas ocasionalmente gatos e humanos. São transmitidos por mosquitos e os adultos vivem no coração de cães, por isso são chamados de “vermes do coração” (NOACK et al., 2021).

2.2.1 Leishmaniose Visceral Canina

As leishmanioses são doenças antroponozoonóticas distribuídas mundialmente causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Há mais de 50 espécies e as de maior relevância estão resumidas na Figura 1 (AKHOUNDI et al., 2016). Elas são classificadas em cutânea, mucocutânea e visceral de acordo com a apresentação clínica em humanos, onde o local de inoculação e a espécie do parasito determinam a manifestação dos sintomas. Existem ainda as formas cutânea difusa e a “leishmaniose cutânea pós-kala-azar” que são variantes ou consequências após tratamento da forma cutânea e visceral respectivamente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Neste trabalho será focado somente na espécie *L. infantum*, a espécie endêmica no Brasil para LV e que causa em cães a LVC. Apesar do nome “visceral” na doença, esse parasitismo em canídeos pode apresentar um amplo leque de sinais clínicos, desde animais assintomáticos, lesões de pele, onicogribose, febre, hepatoesplenomegalia, uveíte até insuficiência renal e morte (NOGUEIRA et al., 2019). Além da óbvia importância para os animais doentes, os cães com LVC servem como hospedeiros reservatórios urbanos da *L. infantum*, sendo uma espécie monitorada pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) do Ministério da Saúde (BRASIL, 2016). Por outro lado, os cães parecem exercer um papel de reservatórios menos importante na leishmaniose cutânea do que os humanos ou outras espécies de roedores (BRASIL, 2017; DANTAS-TORRES, 2007).

Figura 1 - Classificação das principais espécies de *Leishmania* patogênicas. As espécies em negrito são endêmicas no Brasil



Fonte: elaborada pelo autor (2021)

2.2.1.1 Epidemiologia LV e LVC

Os casos de LV são distribuídos mundialmente, mas uma dezena de países concentra mais de 90% dos casos. Anualmente, são contabilizados cerca de 50 mil casos de LV, e no Brasil houve um gradativo aumento de 1990 a 2016 (BEZERRA et al., 2018). A frequência de cães positivos para LVC varia de estado para estado e da metodologia utilizada para amostragem e diagnóstico (Tabela 1) de 0,5% a 50,5%.

Tabela 1 - Dados epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina no Brasil

Autores (ano de publicação)	Cães positivos	Amostra (n)	Diagnóstico	Estado	Ano de coleta
Dantas-Torres. (2006)	40,30%	322	Sorologia	PE	2005
Figueiredo et al. (2018)	6,90%	1446	Sorologia	SP, DF, TO, CE	2008
Leça Júnior et (2015)	50,30 ou 0,00 %	292	Sorologia ou PCR	BA	2010
Brito et al. (2016)	8,40%	391	Sorologia	PB	2010
Gonçalves. (2014)	21,80%	800	Sorologia ou Cultura	BA	2011
Fraga et al. (2016)	14,10%	780	Análise de Classe Latente	BA	2011
Abrantes et al. (2018)	21,60%	110	Sorologia e/ou Cultura	RJ	2011
Silva et al. (2016)	11,33%	362	Sorologia	PB	2012
Ursineet al. (2016)	19,50%	487	Sorologia	MG	2013
Belo et al. (2017)	8,90%	1130	Sorologia	MG	2014
Leal et al. (2018)	22,00%	5822	Sorologia	MG	2014
Kazimoto et al. (2018)	6,78 - 9,94%	4727	Sorologia	RN	2014
Ribeiro et al. (2019)	55,00%	240	Sorologia	DF	2015
Dantas-Torres et al. (2018)	31,60%	95	Sorologia	PE	2015
Lana et al. (2018)	14,80%	9136	Sorologia	MG	2015
Carvalho et al. (2018)	19,20%	600	Sorologia	MT	2016
Fraga et al. (2012)	1,00 - 17,00%	529 - 16558	Sorologia	BA	1997 - 2010
Rondon et al. (2008)	12,60 - 37,6%	1381	Sorologia	CE	2005 - 2007

Freitas et al. (2013)	1,26 - 7,13%	14761 - 126307	Sorologia	CE	2006 - 2012
Rocha et al. (2018)	9,90%	42112	Sorologia	AL	2007 - 2013
Coura-Vital et al. (2014)	6,20 - 8,10%	1226	Sorologia	MG	2008 – 2010
Sousa-Paula et al. (2019)	0,50 - 8,10%	13980	Sorologia	CE	2008 – 2017
Rodrigues et al. (2017)	3,53 - 8,90%	84960 - 126307	Sorologia	CE	2009 – 2013

Fonte: elaborado pelo autor (2021)

2.2.1.2 Ciclo de vida de *L. infantum*

O protozoário *L. infantum* é digenético, apresentando uma forma amastigota no hospedeiro mamífero e uma forma promastigota no vetor artrópode. A capacidade de transmitir *Leishmania* é uma adaptação vetor-parasito adquirida em uma evolução adaptativa das espécies ao longo de milênios, sendo os vetores biológicos da *L. infantum* no Brasil as fêmeas do mosquito-palha, nome informal dos insetos do gênero *Lutzomyia*, sendo as mais abundantes e comprovadamente capazes de manter o ciclo biológico do parasito as espécies *L. longipalpis* e *L. migonei* (RODRIGUES, A. C. M. et al., 2016).

A descrição do ciclo biológico do parasito pode ser descrita a partir do repasto sanguíneo do inseto vetor em um hospedeiro infectado. Nesse momento, o vetor ingere sangue com células do sistema fagocitário infectadas com amastigotas de *L. infantum* (Figura 3 – C1). No inseto, o parasito muda de forma após sair da célula do hospedeiro digerida, o protozoário evolui gradativamente para amastigota (Figura 3 - C1) para promastigota procíclica replicante (Figura 3 - C2), em seguida para promastigotas nectomonas que migram para da região abdominal para região torácica do intestino (Figura 3 – C3) e finalmente para promastigota metacíclica infectante na glândula salivar do inseto (C4) (SUNTER; GULL, 2017).

Finalizado a replicação e dimorfismo no inseto, os parasitos infectantes promastigotas são inoculados em um mamífero no próximo repasto sanguíneo do inseto vetor (Figura 3 – B1). Dentro do mamífero, as promastigotas são fagocitadas e utilizam de mecanismos de evasão para não serem lisadas (Figura 3 – B2). Dentro do sistema monocítico

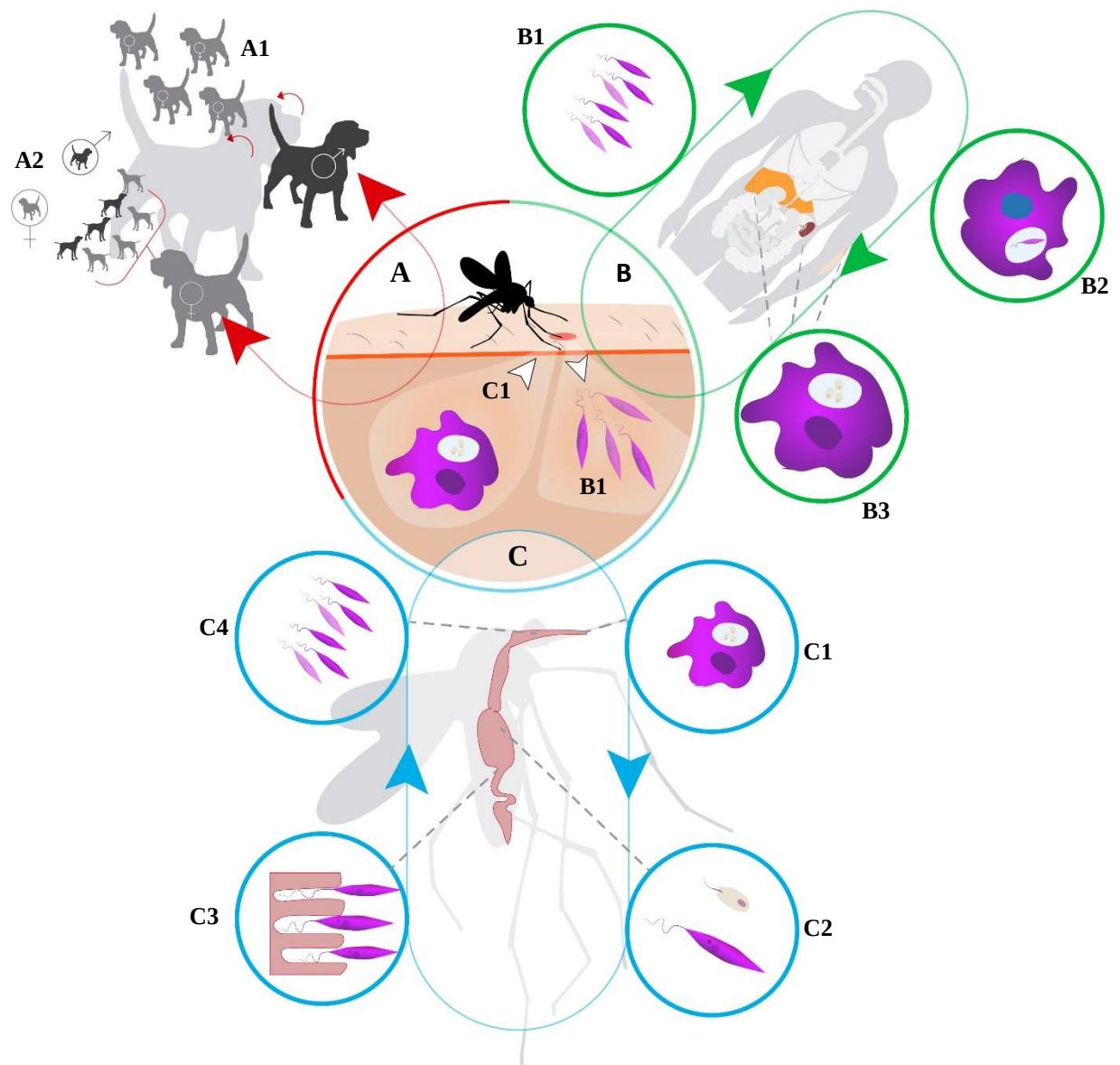
fagocitário, a *L. infantum* transforma-se em amastigota (Figura 3 – B3) tornando o mamífero infectado infectante para o inseto vetor (Figura 3 – C1) (KAYE; SCOTT, 2011).

Há outras formas de transmissão de *L. infantum* além da clássica acima descrita, como por meio de transfusão sanguínea, brigas, venérea e vertical (BOGGIATTO et al., 2011; NAUCKLE et al., 2016; SILVA, F. L. et al., 2009; TOEPP et al., 2019). Dentre essas, somente as duas últimas são consideradas importantes para manutenção do parasito no ambiente. A transmissão venérea ocorre dos machos para as fêmeas (Figura 3 – A1) após o macho adquirir o parasito através do flebotomíneo (Figura 3 – A) ou pela forma vertical transplacentária das fêmeas prenhas infectadas para seus filhotes (Figura 3 – A2) (SILVA, F. L. et al., 2009). A transmissão vertical é perfeitamente capaz de manter o parasito no ambiente durante décadas e deve ser dada mais atenção para ações de controle e prevenção de LV (TOEPP et al., 2019a).

Alguns outros vetores estão sendo investigados como capazes de transmitir *L. infantum*, como o carrapato marrom do cão *R. sanguineus* e outras espécies de flebótomos, mas, apesar de já ter sido detectado material molecular nesses artrópodes, o ciclo biológico nesses vetores ainda não foi demonstrado (VIOL et al., 2016).

Muitos mamíferos possuem potencial para serem hospedeiros dos parasitos do gênero *Leshmania*, dentre estes roedores, xenartos, carnívoros e primatas parecem ser os mais comuns, apesar de questionados quanto a importância epidemiológica, os marsupiais, morcegos e gatos já foram relatados como hospedeiros (REZENDE et al., 2017; ROQUE; JANSEN, 2014). Aqui cabe a diferenciação de hospedeiros simples e reservatórios, os primeiros são qualquer mamífero que possam se infectar e permitir a replicação do parasito em seu organismo, enquanto os últimos são o conjunto de espécies que garante a circulação de um determinado parasito na natureza dentro de um recorte de tempo e espaço. Essa definição de hospedeiro normalmente é dada a uma espécie, mas já se sabe que a capacidade de agir como reservatório ou disseminador do parasito no ambiente varia dentro de indivíduos da mesma espécie (ROQUE; JANSEN, 2014). Exposto o acima, é inegável a capacidade de cães manterem *L. infantum* em ambientes urbanos em áreas urbanas no Brasil nas últimas décadas (Tabela 1).

Figura 2 - Ciclo biológico de *L. infantum*



Fonte: elaborado pelo autor (2021)

Legenda: A: transmissão sem vetor. A1: venérea ocorre dos machos para as fêmeas. A2: transplacentária das fêmeas prenhas infectadas para seus filhotes. B: ciclo no mamífero infectado. B1: os parasitos infectantes promastigotas são inoculados em um mamífero no próximo repasto sanguíneo do inseto vetor. B2: Formas promastigotas são fagocitadas. B3: Dentro do sistema monocítico fagocitário a *L. infantum* se torna amastigota tornando o mamífero infectado infectante para o inseto vetor. C: ciclo no vetor biológico. C1: o parasito muda de forma gradativamente de sua forma amastigota para C2: promastigota pro-cíclica replicante após sair da célula do hospedeiro digerida. C3: *Leishmania* promastigotas nectomonas que migram para da região abdominal para região torácica do intestino. C4: *Leishmania* promastigota metacíclica infectante na glândula salivar do inseto.

2.2.1.3 Imunopatogenia da LVC

A leishmaniose em cães segue um curso crônico, levando no mínimo 3 meses para início da apresentação clínica podendo ser postergada por anos (SANTOS-GOMES et al., 2002). Considerando o ciclo biológico típico, o parasito será inoculado na pele em sua forma promastigota infectante através do vetor artrópode do gênero *Lutzomyia*. Esse evento dará início a uma história imunológica longa e complexa envolvendo vários atores e fatores ainda não totalmente explicados. O dano mecânico do aparelho bucal do vetor somado à saliva, ao gel secretado por promastigotas, à microbiota do inseto e a própria *Leishmania* desencadeia uma reação inflamatória local com recrutamento de células do sistema imunológico. Essa reação da imunidade inata nos primeiros momentos de interação parasito-hospedeiro influenciará o desfecho (CHAUHAN et al., 2017; MEIRA; GEDAMU, 2019; RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012).

Existem vários estudos que descrevem os pontos-chave que determinam o adoecimento do animal, que reflete alta carga parasitária e maior capacidade de disseminar o parasito, comparados com animais que permanecem sem sinais clínicos. Claramente essa regra não é fechada e há variantes biológicas que determinam a capacidade de disseminar o parasito (COURTENAY et al., 2017). Sabe-se que a resposta imunológica adquirida do tipo celular, com perfil de citocinas secretadas por linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1), é predominante em animais infectados com ausência de sinais clínicos. Em contrapartida, os animais infectados doentes possuem um perfil de citocinas do tipo T regulatórios (Treg) (TOEPP; PETERSEN, 2020).

Os primeiros estudos sobre os mecanismos de evasão do sistema imune da *Leishmania* descrevem o fenômeno de “cavalo de troia” em que os parasitos fagocitados por neutrófilos são capazes de inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo e assim permanecer vivos, sem replicar, dentro do fagossomo. Além de inibir a fusão, a *Leishmania major* posterga a morte por apoptose dos neutrófilos e estimula a secreção citocinas quimiotáticas para macrófagos, que são as células alvo dos parasitos, onde eles replicam e sobrevivem. Vale salientar que neutrófilos são células que não voltam para a circulação sanguínea e que por possuírem grânulos citotóxicos, sua remoção dos tecidos é feita por macrófagos, mas estes macrófagos inflamatórios chegam tardiamente ao local da inoculação do parasito (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; PEREIRA et al., 2019; RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012; RITTER; FRISCHKNECHT; VAN ZANDBERGEN, 2009).

Dentro desse contexto, outros mecanismos além do “cavalo de troia” foram sendo descritos, dentre eles o papel dos diferentes tipos de macrófagos, citocinas, queratinócitos, receptores de reconhecimento padrão, proteínas salivares do inseto, proteínas do gel secretório de promastigotas e a própria genética do animal (DEY et al., 2018; MENEZES et al., 2016; SCORZA et al., 2017).

No aspecto genético, existe uma raça de cães, “IbizanHound” ou Podengo Ibicenco, que são naturalmente resistentes à infecção por *Leishmania*. Estes cães aparentam ter uma mutação nos cromossomos relacionados ao complexo de histocompatibilidade maior de classe II (MHC II) que determina uma resposta predominante celular nos indivíduos infectados por *L. infantum* (BATISTA et al., 2020; BURNHAM et al., 2020; VASCONCELOS et al., 2019; QUINNELL et al., 2003).

O perfil de citocinas protetoras para não adoecer são as que mantêm a resposta imune celular ativa em expressão maior que as regulatórias (TOEPP; PETERSEN, 2020). O perfil de citocinas é determinado pelo conjunto dos sinais no momento da apresentação de antígenos nos órgãos linfoides secundários. As células apresentadoras de antígenos (APC) que realizarem o processamento da *L. infantum* via MHC II e apresentar com secreção de IL-12 irão induzir a diferenciação dos linfócitos auxiliares T (LT) virgens a se diferenciar em Th1, que consequentemente produzem citocinas que aumentam a resposta imune celular como a INF- γ . Por outro lado, a *L. infantum* se utiliza de mecanismos que induzem as APC a apresentarem o antígeno com secreção de IL-10 ou IL-4, que estimulam a diferenciação dos LT em Th2, com alta produção de IL-4, IL-13 e IL-10. Essas citocinas promovem a resposta imune humoral, com produção de anticorpos bem como a diferenciação de outros LT em Treg, com maior produção da citocina regulatória IL-10. Nesse cenário, os macrófagos ou células fagocíticas tem sua capacidade de fagocitose inibida, favorecendo a replicação do parasito e desenvolvimento da doença (FALEIRO et al., 2014; KAYE; SCOTT, 2011).

Logo, fica evidente que o ponto a ser esclarecido é o que determina a apresentação de antígeno ocorra nos órgãos linfoides secundários de forma a favorecer a resposta imune celular e não a regulatória. Essa questão apesar de óbvia não é simples de responder, já que existem muitas células e sistemas envolvidos nesse contexto. Alguns estudos com os receptores de reconhecimento padrão mostram que os receptores do tipo toll (TLR) 4, 3, 2 possuem efeitos contraditórios quando estimulados, dependendo da espécie e do momento que foram estimulados, já os TLR-9 parecem sempre conferir proteção contra infecção do gênero *Leishmania* (CHAUHAN et al., 2017; ROSSI; FASEL, 2018).

Outros artigos já mostraram que as células dendríticas que não estão infectadas, mas que foram ativadas pela infecção tecidual parecem produzir IL-12 no momento da apresentação de antígeno favorecendo proteção. Acredita-se que essas células dendríticas “bystander” são ativadas fagocitando restos de *Leishmania* mortas no tecido ou macrófagos infectados com parasitos já mortos (RODRIGUES et al., 2016b).

Em resumo, apesar de sabermos o perfil dos animais que adoecem, não se sabe ainda como induzir os animais a terem uma resposta Th1 diante do desafio da infecção por *Leishmania*. Vale ressaltar que a imunidade contra os parasitos cutâneos, como *L. major*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, difere contra aqueles viscerais, *L. infantum* e *L. donovani* (SCOTT; NOVAIS, 2016). Dito isso, estudos descrevendo os mecanismos de evasão das espécies de *Leishmania* devem ser continuados para o futuro desenvolvimento de vacinas e imunoterapias (AGUIAR-SOARES et al., 2020; ROATT et al., 2014, 2017).

No fim dessa história imunológica, há cães que não adoecem ou se curam. No entanto, outros desenvolvem a LVC. Os sinais clínicos mais comuns são onicogribose, lesões ulcerativas na pele, dermatopatias, uveíte, caquexia, sarcopenia, hepatomegalia, esplenomegalia, hipertrofia de linfonodos e apatia (NOGUEIRA et al., 2019). Nos exames laboratoriais pode ser observados anemia regenerativa, rouleaux eritrocitário, trombocitopenia, aumento da concentração sérica de fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, ureia, creatinina e globulinas, com diminuição da albumina, relação albumina/globulina. Na urina também pode ser detectado secreção protéica aumentada com relação proteína/creatinina aumentada. Os cães que apresentam sinais de insuficiência renal grave têm prognóstico ruim (MAIA; CAMPINO, 2018).

2.2.1.4 Diagnóstico da LVC

Continuando na ótica do cão doente, como membro da família, os responsáveis devem procurar atendimento veterinário na suspeita de LVC. O veterinário pode solicitar, após a avaliação clínica e laboratorial, diversos exames para confirmar o diagnóstico. Podem-se dividir didaticamente os tipos de exames diagnósticos em dois grandes grupos: parasitológicos e sorológicos (Figura 4) (SOLANO-GALLEG0 et al., 2011).

Os exames parasitológicos, como o nome sugere, partem do princípio de detectar o parasito em alguma amostra do animal. Dentre estes exames, há os diretos, os moleculares e a cultura. Aqui serão considerados os exames moleculares como parasitológicos, já que a detecção de material genético é necessariamente precedida de algum parasito no animal, vivo

ou não. Os diretos consistem na visualização do parasito em lâminas de esfregaço ao microscópio ótico de amostras suspeitas de albergarem o parasito como: citologia de linfonodos, medula óssea, lesões de pele, lesões oculares, baço, fígado, urina, líquido encéfalo raquidiano ou qualquer outro tecido em que o veterinário julgue necessário investigar. Estes têm a vantagem de serem baratos e rápidos, no entanto sua sensibilidade vai variar com a habilidade do patologista e da amostra examinada, mesmo em condições ótimas, não passa de 85%. Outra vantagem é que os positivos são confirmatórios, não havendo necessidade de outros exames em animais positivos para fins de diagnóstico (ASSIS et al., 2010; SARIDOMICHELAKIS et al., 2005; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

A imuno-histoquímica é um método direto que se utiliza de princípios imunológicos e químicos: anticorpos anti-fração constantes de anticorpos caninos corados em lâminas histológicas. Com essa técnica, é possível aumentar a sensibilidade dos métodos diretos, mas é laborioso e exige amostras de tecido, sendo a biopsia necessária e a citologia insuficiente. Tem utilidade em pesquisas para determinar a quantidade de parasitos em amostras de tecidos caninos para fins epidemiológicos (TAFURI et al., 2004).

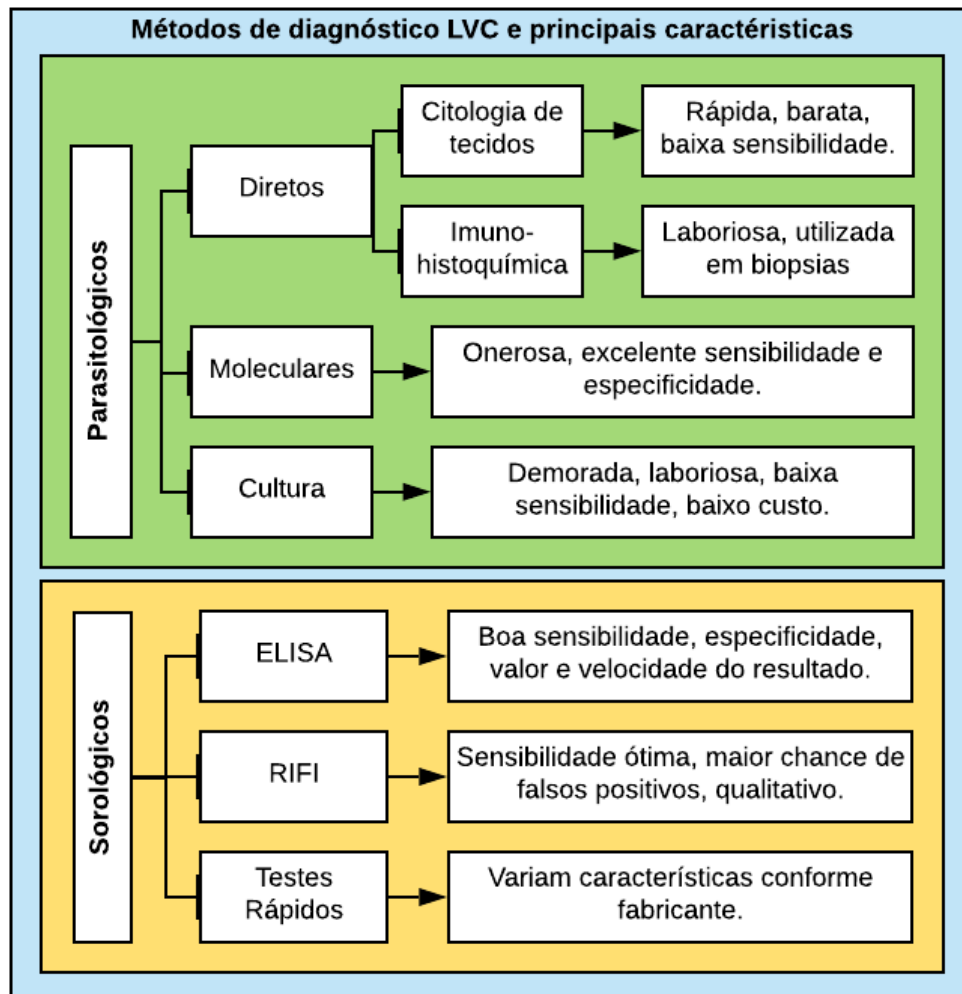
A cultura de *Leishmania* consiste no cultivo de uma amostra de tecido canino em laboratório em condições favoráveis ao parasito. Comumente se utiliza amostras de órgãos linfoides secundários como baço, fígado e medula óssea. O custo é baixo, no entanto o resultado só pode ser confirmado após alguns dias, tempo necessário para confirmar a replicação do parasito no cultivo. Também é mais utilizado em laboratórios de pesquisa (DOS-SANTOS et al., 2008).

Os métodos moleculares são sensíveis e específicos, além de poderem ser utilizados em praticamente qualquer tipo de amostra. No entanto, mesmo sendo uma técnica confiável, sua performance varia de acordo com o método utilizado pelo laboratório de diagnóstico e pela amostra utilizada. Vários autores sugerem as técnicas de Reação de Cadeia Polimerase (PCR), sejam elas quantitativas ou qualitativas, como padrão ouro para detecção de hemoparasitoses em cães, incluindo a LVC. Apesar das vantagens, essas técnicas ainda são mais lentas e onerosas quando comparadas com os métodos indiretos, ditos sorológicos (ASSIS et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2017; RAMPAZZO et al., 2017; SOLANO-GALLEGO et al., 2011;).

Dentre os métodos sorológicos destacam-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e os testes rápidos. A RIFI já foi considerada o padrão ouro para LVC, sendo bastante antiga e simples. Utiliza-se do princípio da detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em amostras de soro. Em uma lâmina de

microscópio com o parasito aderido é adicionada a amostra de soro do cão a ser testada. Após lavagem, são adicionados anticorpos anti-anticorpos caninos com fluorescência. Aqueles anticorpos caninos anti-*Leishmania* irão permanecer aderidos ao parasito na lâmina e os anti-anticorpos com fluorescência irão ligar-se aos anticorpos caninos, permitindo assim a detecção visual destes ao microscópio de fluorescência (SOLANO-GALLEGO et al., 2017).

Figura 3 – Métodos de diagnóstico para LVC e as principais características



Fonte: elaborado pelo autor (2021)

As vantagens da RIFI são o baixo custo, a alta sensibilidade, a relativa velocidade do resultado, sendo mais rápida que a cultura, menos laboriosa que a imuno-histoquímica, mais barata que a PCR, mas não tão rápida quanto os testes rápidos. Além disso, podem-se testar sucessivas diluições do soro do animal até obter fluorescência negativa, método conhecido como “diluição total”. Esse resultado da diluição total quantifica indiretamente os anticorpos anti-*Leishmania* no soro do animal, sendo divulgado em fração de diluição: 1:40-1:80-1:160 e assim sucessivamente. A fração denominadora significa quantas vezes o soro foi

diluído antes da primeira diluição negativa, sendo considerado um exame diagnóstico quantitativo e associado à carga parasitária (VILLANUEVA-SAZ et al., 2019).

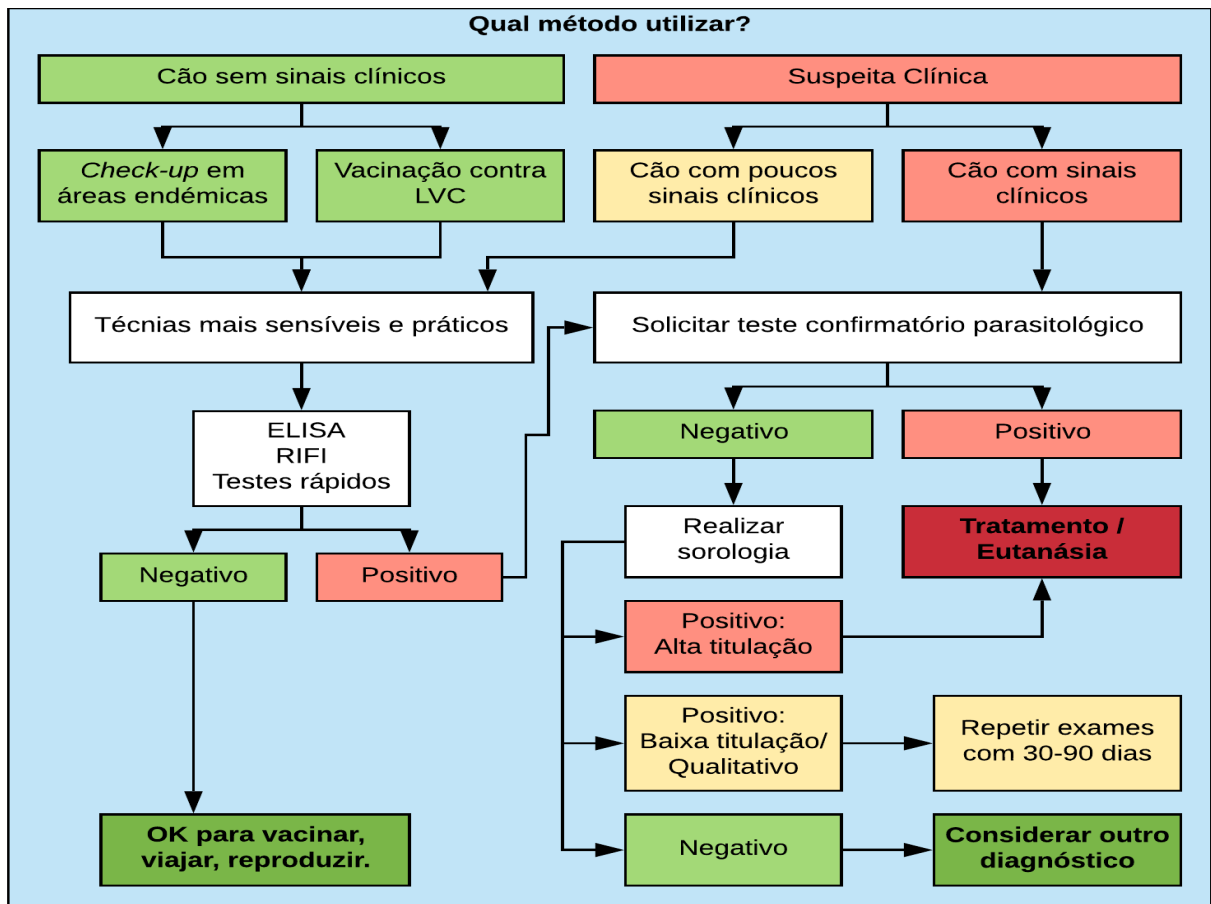
A desvantagem da RIFI é a possibilidade de falsos positivos, já que quaisquer anticorpos capazes de se ligar aos diversos antígenos da *Leishmania* aderida na lâmina vão positivar o teste, mesmo este animal nunca sendo exposto ao parasito, fenômeno conhecido com reação cruzada (KRAWCZAK et al., 2015).

O ELISA é um método indireto que detecta anticorpos através da reação enzimática com mudança da cor do substrato em placas de ensaio lidas no espectrofotômetro. Os resultados são reportados em Absorbância Observada. Essas placas de ensaio são impregnadas com o antígeno que se deseja testar. Essa característica permite termos diferentes performances de ELISA dependendo do antígeno que o laboratório de diagnóstico se utiliza em suas placas. Como consiste em um antígeno específico aderido a placa, sua chance de reação cruzada é em teoria menor que da RIFI, seu tempo e custo também é menor, já que podem ser testadas várias amostras em uma mesma placa. A desvantagem desse método é que não se recomenda a utilização da absorbância como método quantitativo, já que vários fatores podem alterar esse resultado, além de ser um método indireto, que detecta anticorpos, e não o parasito (LIMA et al., 2010).

Por fim, temos os testes rápidos. Estes utilizam diferentes técnicas para detectar anticorpos anti-*Leishmania* em amostras de soro, plasma ou sangue total. Sua performance varia de acordo com o fabricante, sendo suas maiores vantagens a velocidade do resultado, em até 20 minutos, e a facilidade de colheita de amostra, podendo ser usada uma gota de sangue. Suas desvantagens são a confiabilidade da marca do fabricante, sendo necessário o bom julgamento do veterinário que se utiliza dessa ferramenta (DANTAS-TORRES et al., 2018).

A Figura 5 apresenta um fluxograma sugerindo como proceder para diagnosticar LVC. Resumindo a escolha do método varia de acordo da necessidade, clínica, epidemiologia, regionalidade, confiança do médico veterinário nos métodos de cada laboratório, marca ou patologista disponível para realizar o teste, incluindo também a praticidade, custo e velocidade do resultado (SOLANO-GALLEGO et al., 2017)

Figura 4 – Fluxograma de qual método utilizar para diagnóstico da LVC



Fonte: elaborado pelo autor (2021)

2.2.1.5 Tratamento da LVC

O tratamento da LVC apesar de não recomendado pelo PCLV é praticável do ponto de vista clínico veterinário, uma dicotomia indevida entre clínicos e sanitaristas. Hoje no Brasil, temos uma droga disponível exclusivamente para tratamento da LVC. A decisão de tratar deve ser criteriosa e considerar o aspecto ético e a responsabilidade da família do animal no processo, não cabendo ao médico veterinário tomar essa medida sozinho, mas em fornecer informações suficientes para a família poder decidir pelo melhor (NOGUEIRA et al., 2019).

Seguindo a recomendação sanitária, os reservatórios positivos devem ser eutanasiados, incluindo cães (ZUBEN; DONALÍSIO, 2016). Essa medida é respaldada por lei e é um dos desfechos do cão positivo. Em caso de decisão de tratamento, este se inicia no estadiamento do cão doente em 4 ou 5 estágios dependendo da referência utilizada, Leishvet e Brasileish respectivamente (BRASILEISH, 2018; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Neste trabalho vamos usar a classificação brasileira.

O estágio I caracteriza-se por sorologia positiva em baixos títulos, parasitológico negativo, ausência de sinais clínicos e de alterações em exames laboratoriais. O prognóstico do animal é favorável e a recomendação é a terapia com drogas e vacinas que induzam uma resposta imunológica protetora e estes procedimentos o grupo denomina de “imunomodulação” e “imunoterapia”, respectivamente (BRASILEISH, 2018).

Imunomodulação consiste na administração de drogas que de alguma forma induzem um aumento de resposta imune celular do tipo Th1. Essas drogas são de mecanismos de ação diversos e a mais comumente utilizada para LVC é a domperidona (TRAVI; MIRÓ, 2018). A imunoterapia consiste na administração de vacinas ao animal infectado sem sinais clínicos, no intuito de tentar promover a resposta imune celular devido aos adjuvantes presentes nas vacinas, como a saponina (TOEPP et al., 2018). Ambos os procedimentos têm descrição de eficiência na literatura, apesar de não ser 100% são ferramentas utilizadas na prática veterinária.

No estágio II o animal tem parasitológico positivo, baixa a média titulação de anticorpos, leves ou nenhum sinal clínico, ausência de alterações laboratoriais e com perfil renal normal. Neste estágio, Brasileish sugere imunoterapia + imunomodulação + alopurinol + miltefosina. O grupo Leishvet já inicia um animal desses no estágio I. Apesar de não ser totalmente equivalentes, o estágio I Leishvet é similar ao Estádio II Brasileish. O grupo europeu sugere algumas opções terapêuticas, desde acompanhamento do animal até alopurinol com antimonialato de meglumina. Aqui vale ressaltar que continuaremos descrevendo as recomendações do grupo brasileiro, já que as drogas disponíveis na Europa não são as mesmas do Brasil (BRASILEISH, 2018; SOLANO-GALLEG0 et al., 2011).

No estágio III Brasileish o animal já tem titulação que pode ser de baixa a alta, com sinais clínicos aparentes, incluindo dermatites, onicogribose, anorexia e emagrecimento. Anemia não regenerativa, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia e perfil renal normal sérico, mas com aumento da relação proteína/creatinina urinária. O tratamento recomendado pelo grupo será o mesmo do estágio II nos estágios III IV e V, com diferenças nas recomendações para nefropatia e do prognóstico, quanto maior o estadiamento mais reservado é o desfecho do tratamento (PINEDA et al., 2017).

Em todos os casos de tratamento para LVC, as medidas preventivas para impedir o vetor de entrar em contato com o cão infectado devem ser prescritas. Existem diversas ferramentas para esse propósito, desde telas físicas, repelentes para aplicação em cães, inseticidas e manejo do ambiente (LARA-SILVA et al., 2017; LOPES et al., 2018).

Tabela 2 – Estadiamento clínico, manejo e tratamento da leishmaniose canina baseado na sorologia, sinais clínicos e achados laboratoriais

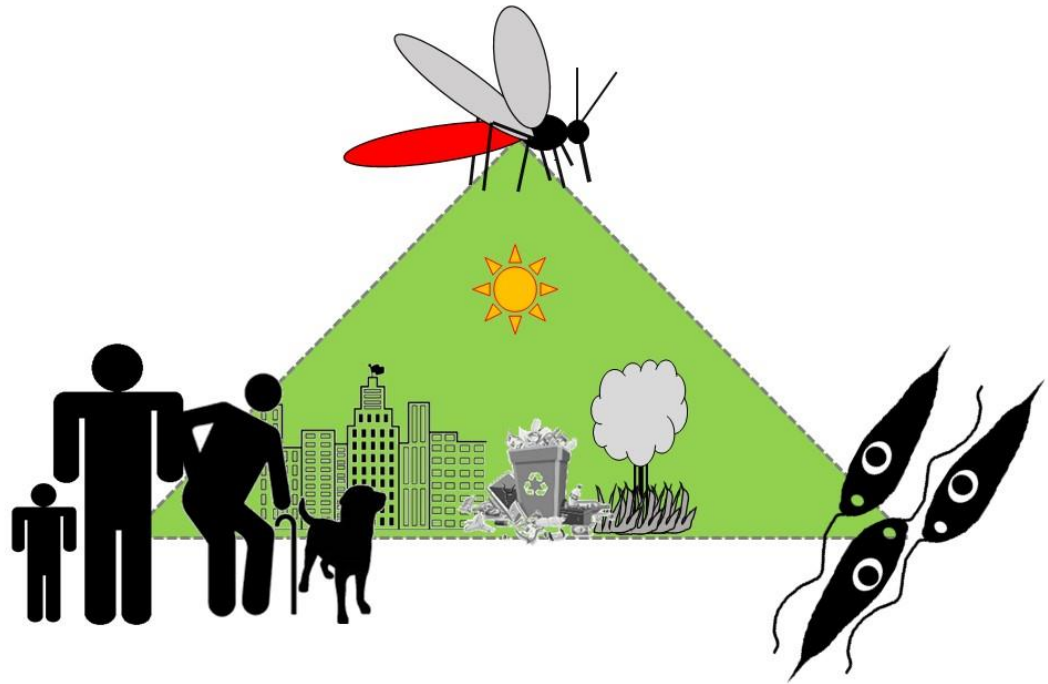
Estádios clínicos	Sorologia¹	Sinais clínicos	Resultados laboratoriais	Terapia²	Prognóstico
ESTÁDIO I Sem doença	Positiva com níveis de anticorpos baixos a médios / parasitológico negativo	Ausentes	Sem alterações	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴	Bom
ESTÁDIO II Sem Doença / Doença leve	Negativa ou positiva com níveis de anticorpos baixos a médios / parasitológico positivo	Sinais clínicos ausentes a leves, como linfadenopatia periférica, dermatite papular, emagrecimento discreto	Geralmente sem alterações. Perfil renal normal	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina	Bom
ESTÁDIO III Doença moderada	Positiva com níveis de anticorpos baixos a altos / parasitológico positivo	Sinais do Estádio II, além de outros como lesões cutâneas difusas ou simétricas, onicogribose, ulcerações, anorexia e emagrecimento	Anemia não regenerativa leve, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome da hiperviscosidade do soro (proteínas totais >12 g/dl) oriundos da formação de imunocomplexos, tais como uveíte e glomerulonefrite. Subestádios a) Perfil renal normal (Creatinina <1,4 mg/dl; RPC <0,5 b) Creatinina <1,4 mg/dl; RPC = 0,5-1	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da nefropatia e controle PSS	Bom a reservado
ESTÁDIO IV Doença grave	Positiva com níveis de anticorpos médios a altos / parasitológico positivo	Sinais do Estádio IV, além de tromboembolismo pulmonar ou síndrome nefrótica e doença renal em estágio final.	Alterações do Estádio III, além de DRC no Estádio 1 (RPC >1) ou 2 (creatinina 1,4-2 mg/dl) da IRIS	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da DRC e controle PSS	Reservado a pobre
ESTÁDIO V Doença muito grave	Positiva com níveis de anticorpos médios a altos / parasitológico positivo	Sinais dos Estádio IV, além de tromboembolismo pulmonar ou síndrome nefrótica e doença renal em estágio final	Alterações do Estádio IV, além de DRC no estágio III (creatinina 2,1-5 mg/dl) e IV (creatinina > 5 mg/dl) da IRIS, ou síndrome nefrótica (marcada proteinúria com RPC >5)	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da DRC e controle PSS	Pobre

Fonte: Brasileish (2018)

2.2.1.6 Prevenção da LVC

Os métodos preventivos para LVC baseiam-se na tríade epidemiológica: parasito-vetor-hospedeiros (Figura 7). Existem métodos voltados a diminuir a carga parasitária, vetorial e aumentar a imunidade do hospedeiro contra a infecção. A diminuição da carga parasitária é feita através do tratamento ou eliminação de hospedeiros, humanos ou não, e vetores infectados.

Figura 5 – Tríade epidemiológica das Leishmanioses Visceral Humana e Canina



Os hospedeiros mamíferos, o vetor biológico flebotômico e o parasito *L. infantum* estão sujeitos às condições individuais e ambientais, que influenciam na transmissão da doença entre os elementos.

Fonte: elaborado pelo autor (2021)

Para o tratamento de hospedeiros infectados, há um gargalo para essa medida: dependência de um método de diagnóstico para detectar os hospedeiros acometidos antes de disseminar o parasito. Há uma demora tanto no diagnóstico de humanos e caninos (AKHOUNDI et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2019), sem mencionar o negligenciamento de outros prováveis hospedeiros e/ou reservatórios urbanos (COURTENAY et al., 2017; DANTAS-TORRES et al., 2019). Logo, essa diminuição de carga parasitária tem um benefício para o indivíduo tratado, mas de baixa eficiência em prevenção para saúde pública. No entanto, o tratamento de um cachorro em uma família responsável através de serviços veterinários não deve ser impedido por lei, já que comprovadamente reduz a carga parasitária no ambiente (NOGUEIRA et al., 2019).

A aplicação de inseticidas ambientais age tanto na redução de carga parasitária, através da eliminação de insetos infectados, como na carga de vetores. O uso domiciliar pode

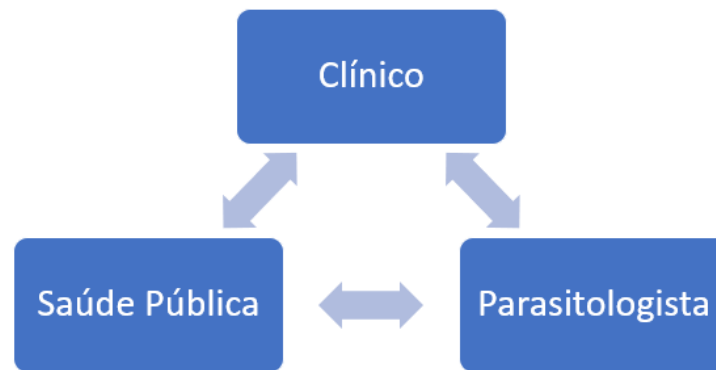
ser bastante benéfico, mas com pouca descrição na literatura científica sobre a eficácia. Para uso em larga escalas nos centros urbanos, compara-se erroneamente o comportamento dos flebotomíneos com culicídeos, transmissores das arboviroses, usando métodos de borrifação inapropriados devido a diferença do ciclo biológico entre essas famílias de insetos (WERNECK, 2014).

Medidas de redução de carga vetorial urbana eficazes descritas são o manejo ambiental considerando os aspectos ecoepidemiológicos como poda das árvores, exposição do solo à luz solar, saneamento básico e recolhimento do lixo (LANA et al., 2018; LARA-SILVA et al., 2017).

Outra medida voltada ao vetor é o uso de inseticidas ou repelentes no animal, além do uso de barreiras físicas, como telas “mosquiteiro” nas casas e canis. Os repelentes e inseticidas ambientais têm período curto de ação residual, logo sendo usado em caso de foco da doença. Por outro lado, o uso de coleiras impregnadas com substâncias inseticidas e repelentes, ou outro tipo de tecnologia, que permite a liberação gradual e distribuição do produto na pele do animal durante um período mais longo (variando de 30-240 dias em apresentações comerciais) são bastante eficazes na diminuição da incidência de LVC em pelo menos 50% (COURA-VITAL et al., 2018; KAZIMOTO et al., 2018; SILVA et al., 2018, 2019; YIMAM; MOHEBALI, 2020).

Exposto o acima, podemos notar que a LVC é um problema de saúde pública por ser uma zoonose e o cachorro ser bastante abundante nos centros urbanos e sensíveis a infecção. Logo, existe uma grande responsabilidade do médico veterinário de lidar com o problema em uma perspectiva de saúde única, abrangendo o cão como paciente clínico, como reservatório urbano ou como parasitologista (Figura 4).

Figura 6 - O cão infectado por *L. infantum*



Isso pode ser observado de três formas distintas no mesmo cenário: como um reservatório e problema de saúde pública, como um paciente necessitando de cuidados veterinários, ou como um hospedeiro de um parasito transmitido por vetor artrópode. cabe ao médico veterinário concatenar as informações e agir de maneira ética para melhor decisão para a população, o indivíduo e as famílias.

Fonte: elaborado pelo autor (2021)

2.2.2 Erliquiose Canina (EC)

As ehrlichioses são doenças causadas por espécies de bactérias Gram negativas do gênero *Ehrlichia*. que parasitam leucócitos de animais domésticos e silvestres, incluindo o homem. Possuem ciclo pleomórfico sendo transmitidas através de carrapatos. O hospedeiro mamífero, o leucócito de preferência e o vetor varia conforme a espécie do microrganismo. As mais comuns são *E. chaffeenses*, *E. canis*, *E. ewingii*, *E. murise* e *E. ruminantium*. Neste trabalho será abordado somente *E. canis*, que infecta preferencialmente monócitos de cães, denominando a EC, também conhecida como febre do carrapato, pancitopenia tropical canina ou erliquiose canina e é transmitida pelo carrapato marrom do cão *Rhipicephalus sanguineus* (THIRUMALAPURA; WALKER, 2014).

Existem alguns trabalhos sobre o potencial zoonótico da *E. canis*, sendo detectável níveis de anticorpos em humanos, no entanto ainda não é considerada uma zoonose (BOUZA-MORA et al., 2017; MAEDA et al., 1987; PEREZ et al., 2006).

2.2.2.1 Epidemiologia da EC

A primeira vez que EC foi descrita, foi denominada de pancitopenia tropical canina, em 1935, e teve bastante importância na guerra do Vietnã, quando o exército americano perdeu vários cães para a doença (BUHLES; HUXSOLL; RISTIC, 1974; RISTIC et al., 1972). É reconhecida mundialmente sendo mais abundante em países tropicais que favorecem a replicação e abundância do vetor. O vetor biológico da *E. canis* é o *R. sanguineus*, sendo um carrapato ixodídeo comum no Brasil e tem uma preferência de se alimentar em cães domésticos. Outras espécies de carrapatos já foram cogitadas na transmissão de *E. canis*, como o *Dermacentor variabilis* e o *Amblyomma cajennense*, no entanto eles são considerados vetores secundários (BREMER et al., 2005; STICH et al., 2008).

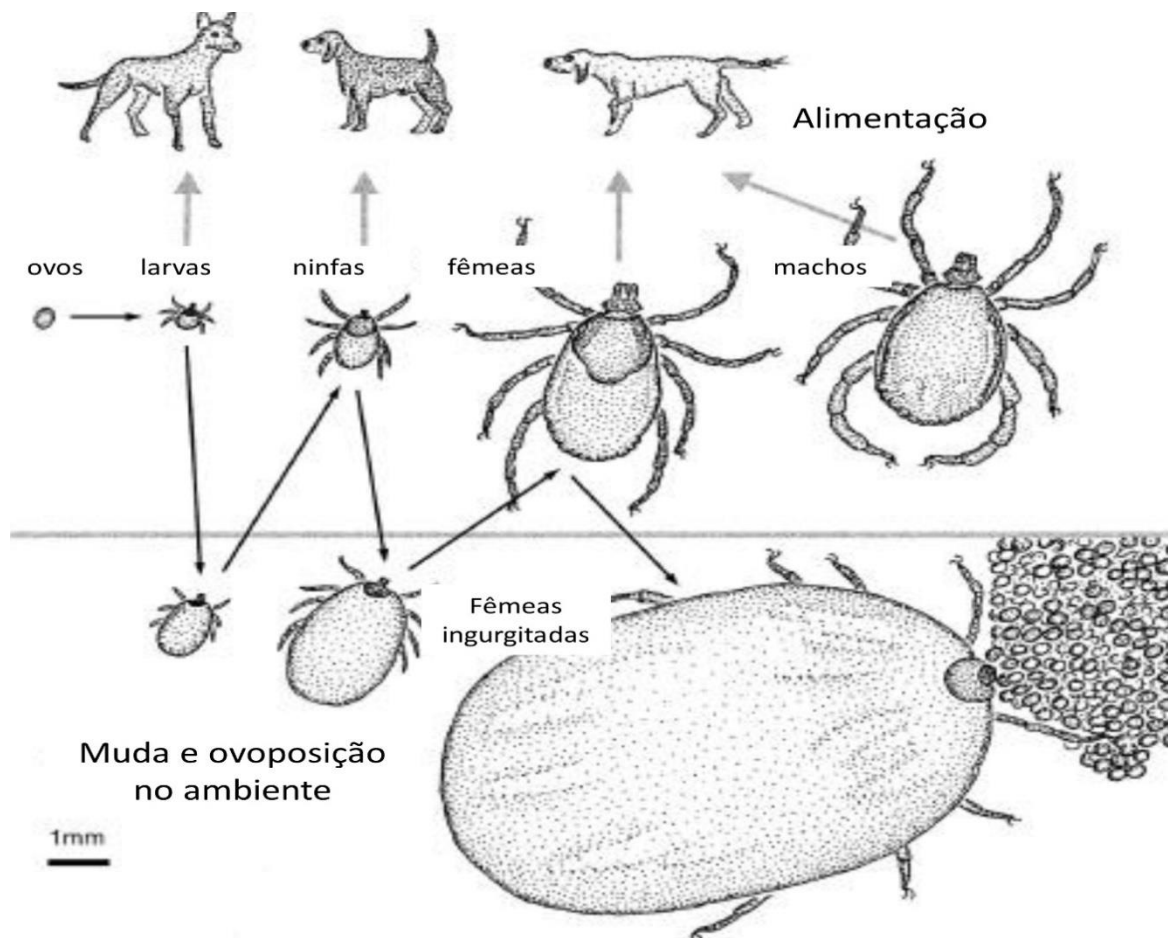
No Brasil, a soropositividade de cães para *E. canis* varia de 4 a 70 % em ambientes urbanos (AGUIAR et al., 2007; DANTAS-TORRES et al., 2018b; SAITO et al., 2008; TANIKAWA et al., 2013; VIEIRA et al., 2011).

2.2.2.2 Ciclo biológico da EC

O ciclo do agente etiológico está diretamente relacionado ao ciclo do carrapato. O *R. sanguineus* é um pertence a família *Ixodidae*, conhecido como carrapato duro por possuir um revestimento quitinoso ou escudo que se estende por toda a superfície dorsal do macho adulto e cobre apenas uma pequena área da fêmea adulta, das larvas e das ninfas. São parasitos temporários, ou seja, passam períodos curtos de suas vidas nos hospedeiros, e carrapatos de três hospedeiros, cada estágio de desenvolvimento tem lugar em hospedeiros diferentes (Figura 9) (DANTAS-TORRES, 2008).

A *E. canis* é inoculada em um cão saudável durante o repasto do *R. sanguineus*, que regurgita corpúsculos elementares infectantes de suas glândulas salivares. Esses corpúsculos são fagocitados pelas células do sistema mononuclear fagocitário e se utilizam de mecanismos de evasão para impedir sua destruição. Dentro desses fagócitos, os corpúsculos elementares se transformam em células reticulares que se dividem por fissão binária e formam as mórulas de corpúsculos elementares, que são então liberados no sistema do hospedeiro infectando novas células fagocíticas (MOUMÈNE; MEYER, 2016).

Figura 7 – Ciclo biológico carrapatos de três hospedeiros



Rhipicephalus sanguineus fêmea deposita seus ovos no ambiente. As larvas eclodem e procuram um hospedeiro para se alimentar. Após ingestão de sangue, desce do hospedeiro para realizar a muda no ambiente. Tornando-se ninfas, procuram novo hospedeiro, repetindo o ciclo entre repastos e mudas.

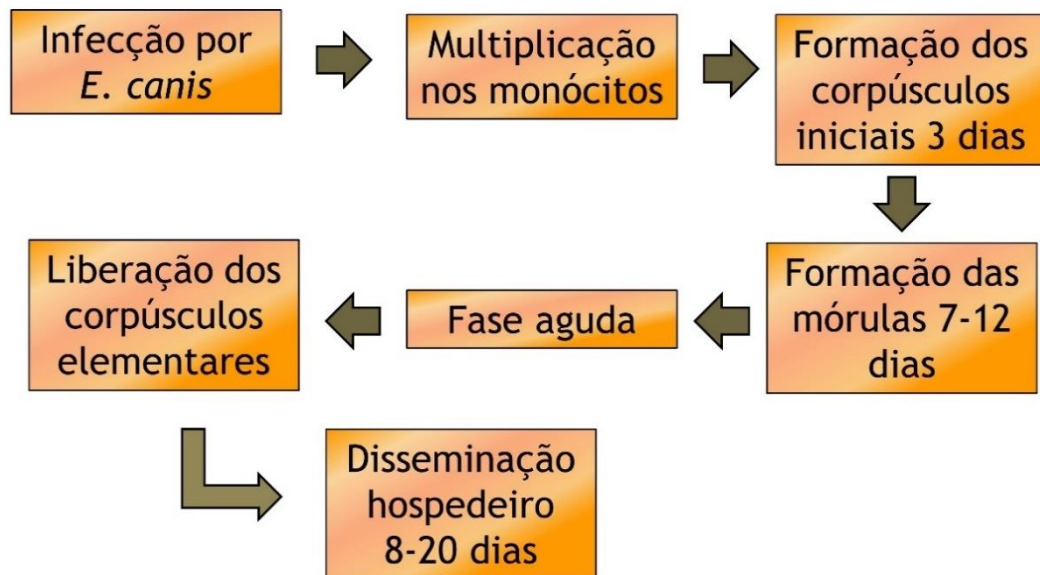
Fonte: adaptado de Greay (2014)

O carrapato marrom adquire as formas infectantes no momento que se alimenta de um cão infectado. O ciclo se perpetua já que o ectoparasito desce do animal para realizar sua muda de estágio e ocorre a transmissão transtadial. Logo, uma larva de carrapato, pode adquirir a bactéria no primeiro repasto, faz a muda no ambiente, transmite a infecção para um novo hospedeiro mamífero durante a alimentação de larva, faz novamente a muda e transmite *E. canis* na fase adulta para um novo cachorro. Vale ressaltar que a transmissão transovariana no vetor não foi comprovada, mas um carrapato macho adulto pode transmitir para vários mamíferos suscetíveis durante seus novos repastos (GRAY et al., 2013).

2.2.2.3 Imuonopatogenia da EC

Dentro do hospedeiro, a *E. canis* é inicialmente ingurgitada por células do sistema imunológico, formando os primeiros corpúsculos elementares 3 dias após inoculação. As mórulas vão ser possíveis de visualizar após 7-12 dias. Neste período, pode ser observada a fase aguda da doença, após a liberação dos corpúsculos elementares, há a disseminação pelo hospedeiro (DUBIE et al., 2014).

Figura 8 - Patogênia da erliquiose canina por *E. canis*.

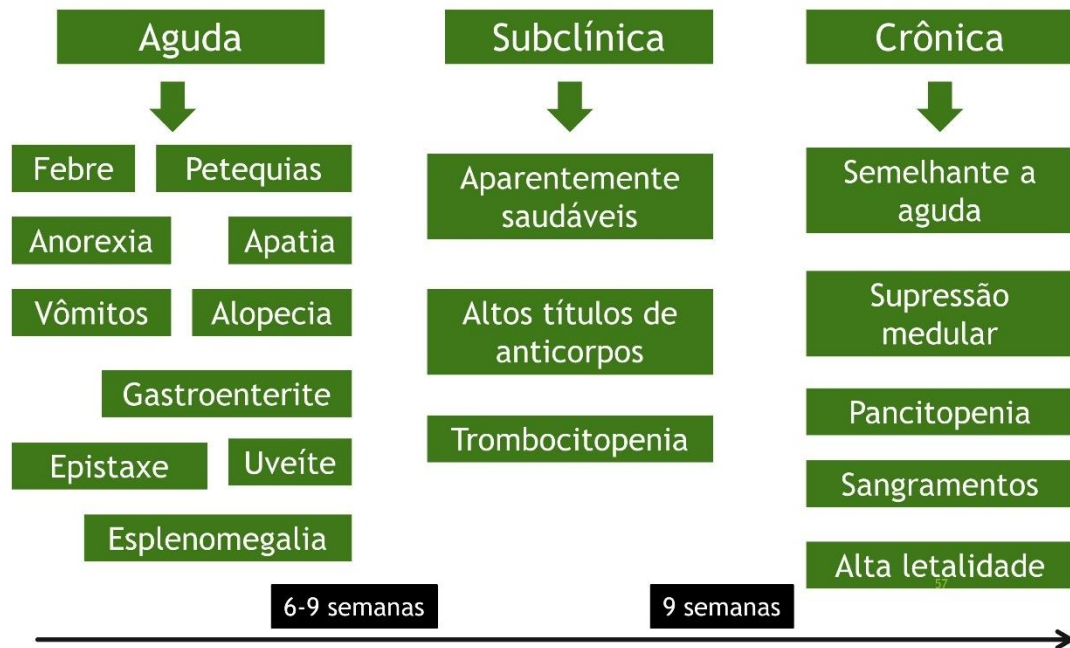


56

Fonte: elaborado pelo autor (2021)

A EC é descrita em três formas clínicas: aguda, subclínica e crônica. Na forma aguda, febre, petéquias, anorexia, apatia, vômitos, diarreia, alopecia, epistaxe, uveíte e esplenomegalia são os sinais clínicos mais comuns ao exame físico. O cão pode ou não ter alterações em exames laboratoriais, como trombocitopenia e diminuição na relação albumina: globulina sérica (BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998a; LIMA et al., 2015; VILLAESCUSA et al., 2015).

Figura 9 - Sinais clínicos nas apresentações aguda, subclínica e crônica da erliquiose canina



Fonte: elaborado pelo autor (2021)

Na fase subclínica, o animal apresenta sinais clínicos leves ou ausentes. Comumente esses animais são diagnosticados através de uma avaliação de rotina pelo médico veterinário que pode observar alopecia generalizada, linfonodos aumentados, trombocitopenia. A alteração sempre presente na fase subclínica é a alta titulação de anticorpos, sendo recomendado o teste sorológico periódico de animais em áreas endêmicas. A detecção de fragmentos moleculares de *E. canis* em animais na fase subclínica é de baixa sensibilidade e varia a performance de acordo com o tecido usado de amostra de cada indivíduo (RODRÍGUEZ-ALARCÓN et al., 2020; WANER et al., 1997).

A apresentação crônica é comumente relacionada a cães que não trataram a infecção na fase aguda e subclínica. Esse estágio clínico é potencialmente fatal, associado aos mesmos sinais clínicos da fase aguda, no entanto, mais graves, com pancitopenia e ausência de resposta terapêutica (MYLONAKIS et al., 2004).

2.2.2.4 Diagnóstico da EC

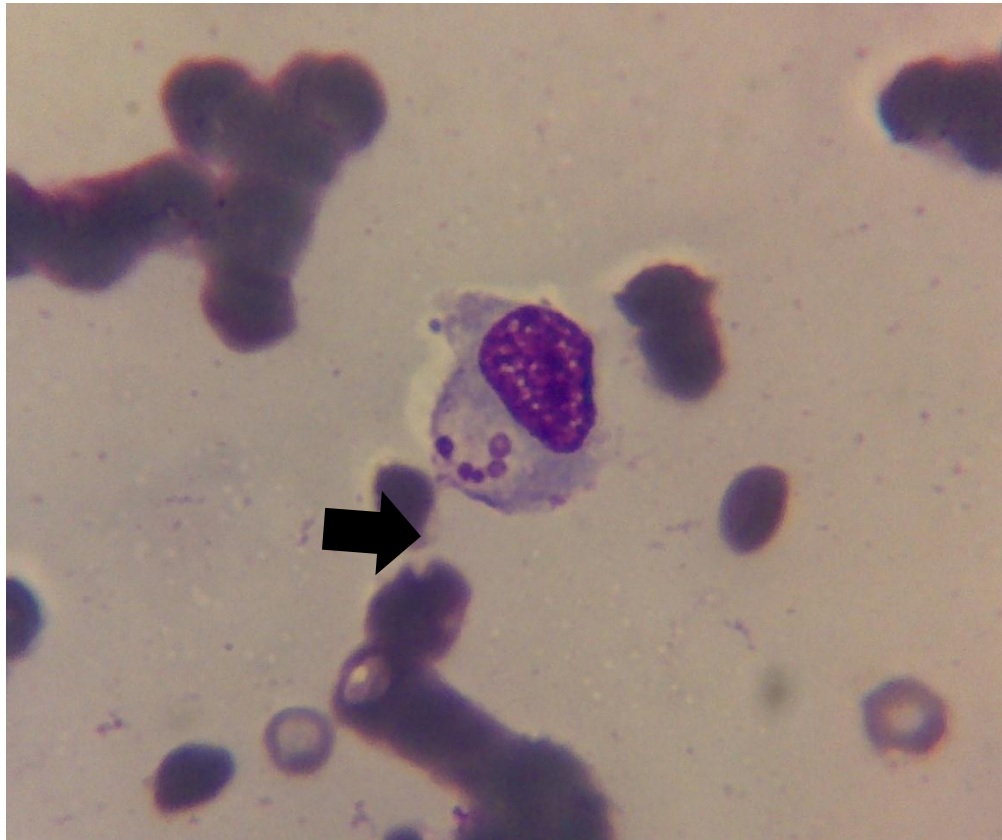
Atualmente o diagnóstico da EC tem múltiplas dificuldades (IRWIN, 2014). Há tecnologias com maiores performances que outras, no entanto, esses métodos exigem equipamentos laboratoriais mais sofisticados e demorados. Em áreas endêmicas é comum médicos veterinários usarem a contagem de plaquetas e sinais clínicos para realizar diagnóstico de EC. No entanto, essas alterações não-específicas ou ausentes são um desafio para diagnosticar e tratar com precisão a infecção (FONSECA et al., 2017; UENO et al., 2009).

O método incontestável para confirmar EC é a identificação da mórula bacteriana dentro de monócitos na citologia de sangue ou medula óssea (Figura 12). A visualização demórula de *E. canis* tem maior sensibilidade na fase aguda da doença, mas varia de 4-60% dependendo do patologista e pode ser confundida com mórula de *Anaplasma phagocytophilum* quando observada em neutrófilos (AGUIAR et al., 2020; BORIN; CRIVELANT; FERREIRA, 2009; MYLONAKIS et al., 2003; UENO et al., 2009). Logo, com a elevada chance de falsos negativos, as citologias teciduais que não são observadas as mórulas bacterianas devem ser interpretadas com cautela em áreas endêmicas.

Nas fases crônica e subclínica, os testes sorológicos como o ensaio de imunabsorbância enzimático (ELISA), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) ou testes rápidos são recomendado (Figura 13), mas cães tratados e curados podem permanecer positivos por meses (RIKIHISA, 2011).

A reação em cadeia polimerase (PCR) pode ser usada como método molecular para detectar material genético de hemoparasitos, sendo recomendado nas fases crônica e aguda de EC, quando *E. canis* estão em maior abundância na corrente sanguínea. (HARRUS; WANER, 2011; UENO et al., 2009). Por muitos anos, a RIFI foi considerada o padrão ouro para diagnóstico de EC (RISTIC et al., 1972), mas hoje os cientistas preferem recomendar a PCR como método confiável, por conta da habilidade da técnica de detectar material bacteriano ao invés de evidencia de exposição por anticorpos de testes sorológicos (DANTAS-TORRES et al., 2018a). Apesar de bastante sofisticada, a técnica de PCR é dispendiosa e laboriosa, o que dificulta seu uso na rotina clínica veterinária. Adicionalmente, a performance da PCR varia de acordo com a amostra do cão testada (MAKINO et al., 2015). Uma sugestão do procedimento para diagnosticar EC está ilustrada na figura 15.

Figura 10 - Citologia de medula óssea com monócito infectado por uma mórula de *Ehrlichiaspp.* (seta). Kit de coloração rápida (Laborclin®, Pinhais, Paraná, Brazil), 100x



Fonte: acervo pessoal (2021)

Figura 11 - Teste rápido para erliquiose canina Alere®



Legenda: A: teste negativo com linha controle visível (C). B: teste positivo com linhas controle (C) e teste (T) visíveis.

Fonte: acervo pessoal (2021)

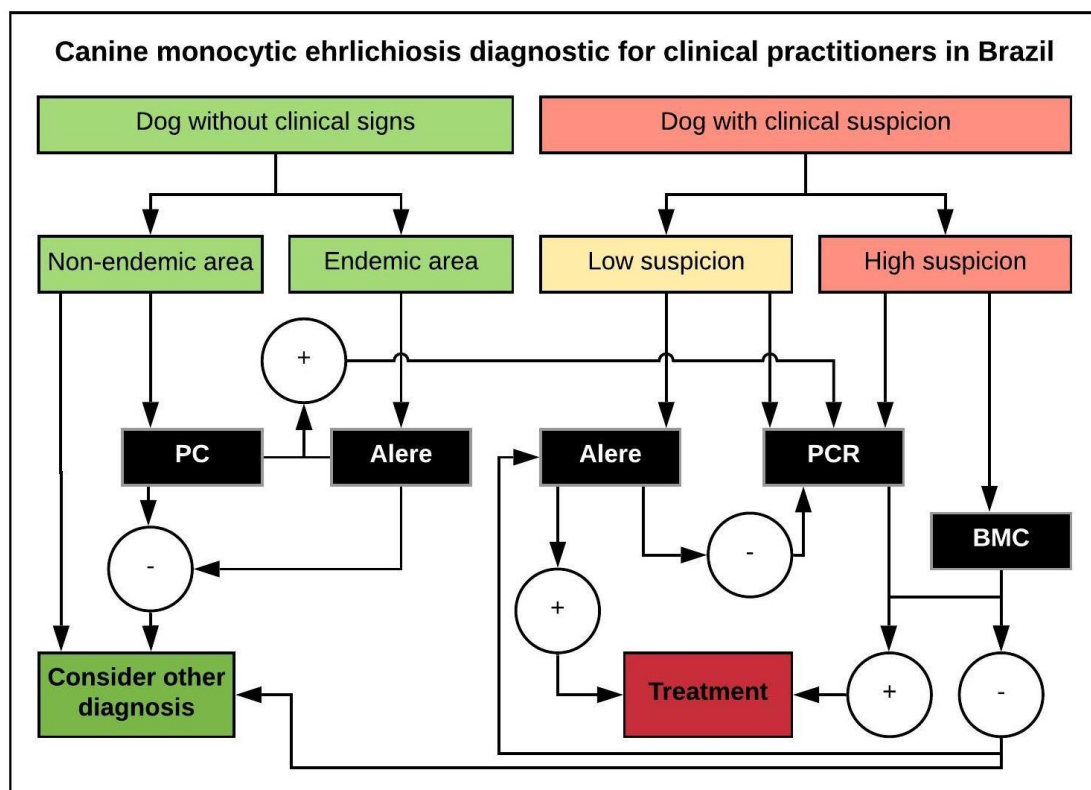
Figura 12 - Teste rápido para erliquiose canina, dirofilariose, anaplasmose e borreliose IDEXX® Snap 4Dx



Legenda: A: teste positivo para erliquiose e anaplasmose. B: teste positivo para erliquiose. C: teste negativo.

Fonte: acervo pessoal (2021)

Figura 13 - Diagrama de como proceder para diagnosticar erliquiose canina



Cães em áreas não endêmicas sem sinais clínicos podem considerar outro diagnóstico. Cães em áreas endêmicas sem sinais clínicos podem utilizar um teste prático e rápido para exames periódicos de rotina e confirmar resultados positivos com um teste confirmatório molecular ou citológico. Cães com alta suspeita clínica em áreas endêmicas podem fazer o teste confirmatório molecular ou citológico e confirmar resultados negativos com testes sorológicos. Cães com sinais clínicos moderados em áreas endêmicas podem fazer a PCR se factível.

Fonte: elaborado pelo autor (2021)

2.2.2.5 Tratamento da EC

O tratamento para EC é feito com administração de antibióticos da família das tetraciclinas, sendo a doxiciclina a primeira escolha. Apesar dessa droga ser eficiente em promover melhora clínica, pode ser necessário dois cursos de tratamento para curar o animal da infecção. Logo, a repetição do tratamento com doxiciclina é recomendado antes de usar drogas alternativas, já que a resistência do gênero *Ehrlichia* às famílias das tetraciclinas não foi reportado. (MYLONAKIS; HARRUS; BREITSCHWERDT, 2019). A associação de corticoides para reverter a trombocitopenia é controversa e não parece beneficiar o animal. A dose recomendada de doxiciclina é de 10mg/kg/dia, podendo ser dividida em duas doses ou uma dose diária (SILVA et al., 2021). A prescrição de fármacos para suporte é de responsabilidade do médico veterinário tratar os sinais clínicos do animal: antieméticos, coagulantes, analgésicos, antitérmicos, anti-inflamatórios, fluido terapia, suplementos entre outros.

2.2.2.6 Prevenção da EC

Ainda não há relatos de imunidade para EC em animais infectados ou expostos. Um animal pode se infectar diversas vezes caso as medidas preventivas contra o vetor não sejam adotadas (BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998b). Atualmente, existem drogas sistêmicas de longa duração (fluralaner, sarolaner, afoxolaner) que são excelentes ferramentas em diminuir a carga do vetor no ambiente, no entanto como o carrapato precisa se alimentar do sangue do cão para ingerir a droga, este ainda pode transmitir a bactéria (JONGEJAN et al., 2016). Então, para um cão infectado é recomendado o uso de drogas sistêmicas para impedir a transmissão e controle da carga vetorial, no entanto é essencial o tratamento periódico do ambiente endêmico com carrapaticidas (MYLONAKIS; THEODOROU, 2017).

3 JUSTIFICATIVA

Cães acometidos com leishmaniose visceral e erliquiose permanecem um desafio para o médico veterinário para além do problema de saúde pública, já que o diagnóstico e tratamento dessas doenças são complexos. Nesse contexto, o entendimento dos fatores de risco para leishmaniose visceral canina, do procedimento diagnóstico para erliquiose canina e a descrição de casos de sucesso de tratamento de comorbidade constituem ferramentas para melhorar o manejo dessas doenças no Brasil.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Fatores relacionados a família, ao ambiente, ao cachorro e a exposição previa de *Ehrlichia canis* são fatores de risco para leishmaniose visceral canina.

Diagnóstico para erliquiose canina no Brasil não pode ser concluído com contagem de plaquetas baixas.

O tratamento de cães com comorbidade de leishmaniose, erliquiose e dirofilariose é possível com o diagnóstico preciso e precoce.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Aprimorar o manejo de erliquiose e leishmaniose visceral canina através de informações sobre a epidemiologia, o diagnóstico e tratamento.

5.2. Objetivos específicos

- a) Determinar os fatores de risco para leishmaniose visceral canina através de um modelo de regressão múltipla incluindo variáveis relacionadas a família, ao ambiente, ao cachorro e a exposição previa de outras doenças transmitidas por vetores;
- b) Comparar a performance, sensibilidade e especificidade, de quatro testes utilizados na prática clínica veterinária para identificar erliquiose canina: Citologia de medula óssea, PCR de sangue periférico, contagem de plaquetas e teste rápido através de análise de classe latente para determinar um guia para veterinários;
- c) Reportar o tratamento de um cão com comorbidade de leishmaniose, erliquiose e dirofilariose.

6 CAPÍTULO I

**Risk factors associated with *Leishmania* seropositivity in Fortaleza city, Brazil:
environmental, social, *Ehrlichia* exposure and dog characteristics**

PREVENTIVE VETERINARY MEDICINE

A ser submetido

**Risk factors associated with *Leishmania* seropositivity in Fortaleza city, Brazil:
environmental, social, *Ehrlichia* exposure and dog characteristics**

Adam Leal-Lima^{a*}, Diana Celia Sousa Nunes-Pinheiro^a, Társsila M Vieira Ferreira^a, Filipe Dantas-Torres^b, Christine Anne Petersen^c, Marie V Ozane^d, Angela J Toepp^e.

*Corresponding author. email: adamlima86@hotmail.com, phone: +55 85 986320001

a: Veterinary Faculty. State University of Ceará. Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza-CE, Brazil. Zip code: 60714-903.

b: FIOCRUZ Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil. Zip code: 50670-420.

c: College of Public Health. The University of Iowa. 145 N. Riverside Drive, Iowa City-IA, United States. Zip code: 52242.

d: Department of Mathematics & Statistics. Mount Holyoke College. 50 College Street. South Hadley-MA, United States. Zip code: 01075.

e: EVMS-Sentara Healthcare Analytics and Delivery Science Institute. Eastern Virginia Medical School. 825 Fairfax Avenue, Norfolk-VA, United States. Zip code: 23507.

Highlights:

- Pioneer study using the one health concept in a multiple regression model for CanL
- *Ehrlichia* exposure, family and dog features are related to *Leishmania* positivity
- Our results show independence between the studied risk factors
- This study provides an updated for CanL epidemiology

Abstract:

Canine leishmaniosis (CanL) and canine monocytic ehrlichiosis (CME) are highly endemic in Brazil. *Leishmania infantum* is the causative agent of CanL and dogs are urban reservoirs for human visceral leishmaniasis. Although several studies have described risk factors associated with *Leishmania* seropositivity, limited studies have combined

environmental, social and dog characteristics, including the exposure to other vector-borne pathogens, such as *Ehrlichia canis*, the causative agent of CME. As such, in this cross-sectional study, we describe risk factors associated with *Leishmania* seropositivity in Fortaleza city, Brazil, associating dog characteristics, *Ehrlichia* exposure, family socioeconomic status and environmental factors using a multiple logistic regression model. A total of 521 dogs were included and 20.7% of them were positive to *Leishmania*. Large dogs (seropositivity = 31.0%) and dogs from families in the social stratum 7 (seropositivity = 66.7%) were more exposed to *Leishmania*. The multivariable logistic regression model showed that sleeping outside (OR: 2.32), house social class (OR: 1.39), *Ehrlichia* positivity (OR: 2.01), and dog size (OR: 1.82) were significantly associated with *Leishmania* seropositivity ($p < 0.05$). We conclude that lower social stratum, large size, sleeping outside the house and *Ehrlichia* exposure are important risk factors for *Leishmania* seropositivity in dogs in Fortaleza. Future large-scale studies are needed to access whether these four variables are also risk factors for *Leishmania* exposure in other areas where CanL is endemic in Brazil, possibly also including more human and vector data.

Keywords: Epidemiology, *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, One Health, Prevalence.

Abbreviations:

ABEP: Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa

AIC: Akaike Information Criterion

CanL: canine leishmaniasis

CEUA: Comissão de Ética para o Uso de Animais

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CI: confidence interval

CME: canine monocytic ehrlichiosis

DPP®: dual path platform

LIBA: Laboratório de imunologia e bioquímica animal

OR: odds ratio

RR: relative risk

UECE: Universidade Estadual do Ceará

VL: human visceral leishmaniasis

Background:

Dogs are nowadays part of our families, sharing our homes with close contact. This relationship developed over millennia has its benefits and drawbacks. One of these drawbacks is canine vector-borne diseases, which some are of zoonotic concern with higher frequency in tropical and subtropical regions. In this context, Brazil is a country with continental dimensions, where canine leishmaniosis (CanL), canine monocytic ehrlichiosis (CME), and other vector-borne diseases are endemic (Leal *et al.*, 2018; Otranto *et al.*, 2009; Willi *et al.*, 2017).

Leishmania infantum is the main causative agent of CanL in Brazil and dogs are one of several urban reservoirs of this parasite in the zoonotic transmission cycle of human visceral leishmaniasis (VL) (Roque and Jansen, 2014). Indeed, a correlation between seropositive dogs and VL has been reported, therefore, dogs infected by *L. infantum* are considered a public health problem (Freitas *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2017). Canine seropositivity can range from 4-15% (Governo do Estado do Ceará, 2018; Varjão *et al.*, 2021), and it is associated with an inadequate immune response (Toepp and Petersen, 2020).

The risk factors associated with CanL in Brazil are dog size, sleeping/staying outside, dark fur color, short fur length, age, organic matter in the backyard, and low social class (Carvalho *et al.*, 2019; Coura-Vital *et al.*, 2013; Leal *et al.*, 2018; Rondon *et al.*, 2008; Varjão

et al., 2021). Although several studies have assessed the risk factors associated with *L. infantum* infection in dogs, studies rarely have been conducted from a one-health perspective, where human, environment and animal health are interconnected and thus should be managed together (Belo *et al.*, 2013; Dantas-Torres *et al.*, 2019).

One of the risk factors described for CanL in Cyprus, not addressed by the studies in Brazil, is exposure to *Ehrlichia canis* (Attipa *et al.*, 2019). *E. canis* is a Gram negative, obligate intracellular bacterium, which can modulate the host immune response (Lina *et al.*, 2017; Rikihisa, 2010). In Brazil, seropositivity to *E. canis* range from 4 to 75% (Vieira *et al.*, 2011). As so, this study is part of a cohort study to determinate relative risk of dogs exposed to *E. canis* acquire *L. infantum* infection. In this cross-sectional part, we analyzed risk factors associated with positivity to *Leishmania* in Fortaleza city, Ceará state, Brazil, including dog characteristics, *E. canis* exposure, family socioeconomic status and environmental factors using a multiple logistic regression model.

Material and methods

Study area

This cross-sectional study was conducted in two areas in Fortaleza, Ceará, Brazil, during first semesters of 2018 and 2019. The areas are described by the city hall as “Regional I” and “Regional VI” and aggregate neighborhoods for municipality organization. These regions were selected by logistical criteria and high endemicity for VL. The logistical criteria were available field teams for *Leishmania* serological investigation, annual availability of tests for active survey for CanL, and trained personal for dog blood sampling. Located in northeast Brazil, Fortaleza (3°43 02” S, 38°32’35” W, 16 m altitude) has a tropical hot sub-humid climate, with a 1338 mm annual precipitation, 26-28° C median temperature, and rainy season ranging from January to May. The city is home to 2,703,391 inhabitants, and 243,190

dogs (IBGE 2021, IPECE 2018) and CanL are endemic in Fortaleza for more than half century (Alencar, 1959), with 367 cases registered between 2014 and 2017, of which 10.3% were fatal cases (Almeida *et al.*, 2020). CanL seropositivity ranged from 4 to 13% during 2015-2018 (Governo do Estado do Ceará, 2018).

Ethical approval

This study was approved by Ceará State University Ethical Committee for Animal Use and by Research Ethical Committee (CEUA and CEP - UECE) protocols numbers respectively. Dog owners signed an informed consent after being informed of the research objectives and allowing dog blood sampling and inquiry application. All dogs were restrained by their owners to avoid injury to the animals, families, and researchers.

Dog population

This study is the cross-sectional results from a cohort that aimed to determinate relative risk of dogs exposed to *E. canis* to be positive for *Leishmania* compared to non-exposed dogs. For this we considered 10% positivity to *Leishmania*, expected RR of 2.0, statistical power of 0.8 and confidence level of 95%, and proportion of exposed/non-exposed of 2. Entering this data on a sample size calculator (<https://www.openepi.com/SampleSize/SSCohort.htm>) resulted in a minimum 137 non-exposed dogs and 273 exposed. Since we considered a 20% loss to follow up and our sampling method was house to house, we collected more samples to satisfy our cohort inclusion criteria.

For this cross-sectional study, inclusion criteria were: legal responsible person of the family (age > 18 years) signing the consent term, having at least one dog at the house, dog had to be manageable, dual path platform (DPP®) or IDEXX® Snap test for CanL performed, 4Dx IDEXX® Snap Test performed, and social-economical stratification completed. As exclusion criteria, dogs that were missing a CanL test (DPP®/IDEXX®), 4Dx Snap, or social-

economical stratification were excluded. Also, aggressive/unrestrained dogs, families that refuse to participate for personal reasons, dogs younger than six months old, and pregnant bitches were excluded.

Data collection

This study was conducted in collaboration with Fortaleza municipal healthcare service. Trained field teams sampled the dogs and interviewed the legal responsible person using a previously tested questionnaire. Veterinarians from our group followed and assisted the field teams. The questionnaire included information for social-economical stratification, dog characteristics, household description and habits (S1 Questionnaire).

The Brazilian Association of Research Companies (ABEP) method for social-economical stratification was applied. This questionnaire comprises information about belongings, education level, potable water, and street pavement scoring from 0-43 points. Household/family are grouped into seven strata from 1-7; 1 comprises the more highly educated and wealthy, and 7 includes the least fortunate families (S1 Questionnaire).

Dog characteristics included categorical age (young < 2 years, adult 2-6 years, senior > 6 years old), sex, size, fur length, fur color, rabies vaccine, other vaccines, frequency of deworming, presence of ticks/fleas, use of insecticide-impregnated collar, frequency of bath, and insecticide bath (S1 Questionnaire).

For habits, the questionnaire asked where the dog sleeps (inside vs. outside), street access (free or restrained), food type (industrial or human leftovers), veterinary check-up (yes/no), medicine administered, insecticide in the environment, and fecal disposal (S1 Inquire).

Household description included backyard, organic matter in the backyard, backyard type of floor, presence of chickens, birds, swine, opossum, cats, fruit trees, and more than one dog. A total of 58 questions were in the questionnaire (S1 Questionnaire).

Blood collection

Canine blood samples were collected by venipuncture (2 - 4 mL). A drop of blood was used for DPP® testing at the household, as part of the municipal health survey routine. The other fraction of the blood was distributed into tubes without anticoagulant and transported to Ceará State University Animal Immunology and Biochemistry Laboratory (LIBA) at 8° C. In the laboratory, blood samples were centrifugated and serum samples were aliquoted into 2 mL microtubes and stored at -20° C for posterior SNAP tests. SNAP *Leishmania* and SNAP 4Dx plus (*Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Dirofilaria immitis* and *Borrelia burgdorferi*) (IDEXX®) were made according to manufacturer's instructions.

Statistical analysis

All data were entered into an Excel® file. Personal information, such as address, phone number, and name of the legal responsible person, were not used in any analysis. Results were described as frequency and statistical analyzes were performed using R statistical software, Version 4.0.1. A multivariable logistic regression model was used to estimate the odds ratio for *Leishmania* seropositivity given the variables collected using the questionnaire and serological tests. For social-economic status, the final stratification class (1 to 7) was used and treated as numerical rather than categorical due to its natural ordering. A dog was considered positive if positive by DPP® and/or SNAP *Leishmania*. The variables with $p < 0.05$ were considered significant.

Results

A total of 345 households were visited and 521 dogs were included. Population features and seropositivity to different tests and pathogens are described on Table 1. We selected the model reported based on the Akaike Information Criterion and used in the multivariable logistic regression the following variables: household social stratum (1 to 7),

seropositivity to *Ehrlichia* (positive or negative), dog age (adults, young or senior), sex (male or female), fur length (long or not long), fur color (dark or light), dog size (large or not large), sleep location (inside or outside), cats in the house (yes or no), and multiple dogs (yes or no). These variables were considered to explain seropositivity to *Leishmania*.

Most of the population studied were in social strata 4, 5, and 6, with a low number in the social strata 1 and 2. Males and females were closely distributed, as well as fur color, sleeping location, cats in the house and presence of more than one dog in the house. Most of the dogs were not large in size, adults and with short fur (Table 1).

The overall positivity to *Leishmania* was 20.7% considering positivity to any test, 10.9% only to DPP®, 14.6% only to Snap®, and 5.1% to both tests. Note, 34 of the included dogs did not have DPP® results. Tests for *Leishmania* had fair agreement calculated by Cohen's kappa coefficient ($\kappa = 0.2915$) with 83.6% observed agreement (Table 2). For *Ehrlichia*, 62.4% of the dogs were positive. The characteristics with highest positivity for *Leishmania* were social stratum 7 (positivity = 66.7%), followed by large size (31.0%). In contrast, social stratum 2 and long fur length had the lowest frequency *Leishmania* (0.0% and 13.2% respectively) (Table 1).

The multivariable logistic regression model showed that sleeping outside and house social class are significantly associated with *Leishmania* positivity ($p < 0.001$). The odds are 2.32 times greater of a dog sleeping outside is seropositive compared to dogs sleeping inside the house. Lower social class families have 1.39 more chance to have a *Leishmania*-positive dog compared to the previous stratum. *Ehrlichia* positivity and dog size showed to be significant to *Leishmania* ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) with calculated odds ratio of 2.01 and 1.82, respectively (Table 3). The other variables were not associated to *Leishmania* positivity.

Table 1: Demographics of canine cross-sectional population ($n = 521$)

Variable	<i>n</i>	%	<i>Leishmania</i> seropositivityanytest (%)	<i>Ehrlichia</i> seropositivity (%)
<i>Leishmania</i>seropositivity (anytest)	108	20.7	NA	75.0
<i>Leishmania</i>seropositivity (DPP®)	57	10.9	NA	71.9
<i>Leishmania</i>seropositivity (SNAP®)	76	14.6	NA	77.6
<i>Ehrlichia</i>seropositivity (SNAP®)	325	62.4	24.9	NA
<i>Anaplasma</i>seropositivity (SNAP®)	128	24.6	21.1	89.1
House social stratum				
1	5	1.0	20.0	100.0
2	5	1.0	0.0	40.0
3	92	17.7	16.3	61.2
4	164	31.5	15.2	56.7
5	113	21.7	22.1	50.4
6	133	25.5	27.1	77.4
7	9	1.7	66.7	88.9
Sex				
Male	247	47.4	21.0	63.6
Female	274	52.6	20.4	61.3
Age				
Young	121	23.2	17.4	35.5
Adult	296	56.8	21.3	66.5
Senior	104	20.0	23.1	81.7
Furlength				
Notlong	415	79.6	22.6	55.6
Long	106	20.4	13.2	69.8
Fur color				
Light	276	53.0	22.5	63.1
Dark	245	47.0	18.8	61.0
Dog size				
Large	84	16.1	30.9	60.7
Notlarge	437	83.9	18.8	62.7
Sleeplocation				
Inside	242	46.4	13.2	60.3
Outside	279	53.6	27.2	64.2
Cats in the house				
Yes	320	44.5	24.6	66.4
No	199	53.2	17.3	59.6
Multiple dogs				
Yes	320	61.4	22.50	64.1
No	199	38.2	18.1	59.3

Table 2: *Leishmania* serology test results agreement

Test	DPP®		Total
SNAP® <i>Leishmania</i>	+	-	
+	25	48	73
-	32	382	414
Total	57	430	487

Observed agreement: 83.6%. Observed Kappa: 0.291; fair agreement

Table 3: Multiple logistic regression model to explain canine leishmaniosis positivity

Parameter	OR	95% CI	Coefficient	Std. error	z value
House social stratum***	1.39	1.149 – 1.696	0.3302	0.0992	3.327
<i>Ehrlichia</i> seropositivity**	2.01	1.204 – 3.442	0.6986	0.2671	2.615
Sex	1.02	0.648 – 1.603	0.0196	0.231	0.085
Age (senior)	1.08	0.520 – 2.257	0.0792	0.373	0.212
Age (adult)	1.05	0.580 – 1.935	0.0464	0.3060	0.152
Sleep location***	2.32	1.441 – 3.792	0.8399	0.2461	3.413
Size*	1.82	1.030 – 3.152	0.5963	0.2844	2.097
Fur color	0.83	0.527 – 1.295	-0.1885	0.2289	-0.823
Fur length	1.61	0.863 – 3.179	0.4763	0.3305	1.441

OR: Odds Ratio. CI: Confidence interval. Std. Error: Standard error

Significance codes: * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001

Discussion

To the best of our knowledge, this study is the first to estimate the odds ratio for *Leishmania* seropositivity including dataset variables related to the family, dog characteristics, environmental and *Ehrlichia* exposure from the same study in a multiple logistic regression model. This concept of One Health is relatively antique but increased its repercussion in the recent years and is at its peak with the COVID19 pandemic (do Vale *et al.*, 2021). We could not include vector survey due to financial, personnel, and logistical impediments.

Our findings support previous reports where dog size, *Ehrlichia* exposure, family income and sleeping outside are risk factors for *Leishmania* seropositivity (Attipa *et al.*, 2019; Coura-Vital *et al.*, 2011; Leal *et al.*, 2018). We ran models controlling for sex, dog size, *Ehrlichia* exposure, sleeping location, and for family social strata, but the best fitting model, according to AIC, is reported on Table 3.

The finding of family social strata as a risk factor for *Leishmania* seropositivity agrees with previous studies showing low education level and income as significant risk factors for *Leishmania* seropositivity (Carvalho *et al.*, 2019). In this study, we used a more reliable method of socioeconomic classification that unifies education and income, also considering that improving education and providing better living conditions to the population may reduce the risk of several infectious and non-infectious diseases (Barreto *et al.*, 2011).

Ehrlichia exposure was reported as significant risk factor for *Leishmania* seropositivity. This is the first study to assess *Ehrlichia* seropositivity with family social strata, as well as dog and environmental characteristics (Belo *et al.*, 2013). We hypothesized that one important variable in one study would not be significant if added variables concerning another spectrum. It is important to emphasize this, since we could theorize that large dogs sleep more outside than small dogs, which is true, but does not lessen the significance of being a large dog. In fact, our data shows 34% of large dogs (29/84) sleep inside compared to 49% of not large dogs (213/437). Sleeping outside is easy to relate to *Leishmania* seropositivity as it increases exposure to the sand fly vector, on the other hand, being a large dog is not proven why is more likely to be positive (Rondon *et al.*, 2008). Some authors hypothesized that their larger body surface and increased production of attractants (e.g., heat and CO₂) make large dogs more attractive to phlebotomine sand flies, as compared to smaller dogs (REF). In turn, this could make them more susceptible to *Leishmania* infection.

Our study has some limitations as any field study. The first is the sample size calculation, as we considered one exposure factor only (i.e., *Ehrlichia* seropositivity) for a cohort study. The more variables are added to a study, the greater the required sample size to estimate effects of characteristics with enough power. Other limitations include the lack of vector and VL data. The questionnaire used herein included information past VL cases in the household, but the probability to visit a household with past VL history in Fortaleza is low, considering that in average only 106 cases are notified annually in this city (Governo do Estado do Ceará, 2018).

Despite these limitations, this study is epidemiologically relevant as we provide important data about the epidemiology of CanL, showing that social stratum, dog size, dog sleeping location and *Ehrlichia* exposure are important risk factors for *Leishmania* seropositivity in Fortaleza. Adequate knowledge of risk factors may contribute to preventive actions, which are essential for lowering vector transmission and, thus, VL incidence (Lima *et al.*, 2017). Finally, future studies are needed to access these four variables in other areas where CanL is endemic, possibly also including more human and vector data.

Conclusion

Based on our results, we can conclude that improve education and wealth of the families, stimulate the dogs to sleep inside the house, and avert tick bites can be preventive measures for CanL. We emphasize that the multiple regression model was adequate to show the independence between the environmental, social, and individual variables studied associated with CanL. Additionally, CanL association with social variables proves that One Health concept is more adequate in endemic urban areas. Longitudinal studies are suggested to acknowledge the exposure vs. outcome bias.

Acknowledgements

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Manutenção e Desenvolvimento da Educação Básica (FUNDEB), the Unidade de Vigilância de Zoonoses (UVZ) of Fortaleza, and Idexx Laboratories.

Funding

This study was sponsored by Idexx Laboratories provided the SNAP 4Dx tests.

References:

- Almeida, C.P., Cavalcante, F.R.A., Moreno, J. de O., Florêncio, C.M.G.D., Cavalcante, K.K. de S., Alencar, C.H., 2020. Leishmaniose visceral: distribuição temporal e espacial em Fortaleza, Ceará, 2007-2017. *Epidemiol. e Serv. saude Rev. do Sist. Unico Saude do Bras.* 29, e2019422. <https://doi.org/10.1590/S1679-49742020000500002>
- Attipa, C., Solano-Gallego, L., Leutenegger, C.M., Papasouliotis, K., Soutter, F., Balzer, J., Carver, S., Buch, J.S., Tasker, S., 2019. Associations between clinical canine leishmaniosis and multiple vector-borne co-infections: a case-control serological study. *BMC Vet. Res.* 15, 331. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2083-6>
- Barreto, M.L., Teixeira, M.G., Bastos, F.I., Ximenes, R.A., Barata, R.B., Rodrigues, L.C., 2011. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: Social and environmental context, policies, interventions, and research needs. *Lancet* 377, 1877–1889. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60202-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60202-X)
- Belo, V.S., Struchiner, C.J., Werneck, G.L., Barbosa, D.S., de Oliveira, R.B., Neto, R.G.T., da Silva, E.S., 2013. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. *Vet. Parasitol.* 195, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.010>

- Carvalho, A.G., Luz, J.G.G., Rodrigues, L.D., Dias, J.V.L., Fontes, C.J.F., 2019. Factors associated with *Leishmania* spp. infection in domestic dogs from an emerging area of high endemicity for visceral leishmaniasis in Central-Western Brazil. *Res. Vet. Sci.* 125, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.06.013>
- Coura-Vital, W., Marques, M.J., Veloso, V.M., Roatt, B.M., de Oliveira Aguiar-Soares, R.D., Reis, L.E.S., Braga, S.L., Morais, M.H.F., Reis, A.B., Carneiro, M., 2011. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001291>
- Coura-Vital, W., Reis, A.B., Fausto, M.A., de Leal, G.G.A., Marques, M.J., Veloso, V.M., Carneiro, M., 2013. Risk Factors for Seroconversion by *Leishmania infantum* in a Cohort of Dogs from an Endemic Area of Brazil. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071833>
- Dantas-Torres, F., Miró, G., Baneth, G., Bourdeau, P., Breitschwerdt, E., Capelli, G., Cardoso, L., Day, M.J., Dobler, G., Ferrer, L.L.L., Irwin, P., Jongejan, F., Kempf, V.A.J., Kohn, B., Lappin, M., Little, S., Madder, M., Maggi, R., Maia, C., Marcondes, M., Naucke, T., Oliva, G., Pennisi, M.G., Penzhorn, B.L., Peregrine, A., Pfeffer, M., Roura, X., Sainz, A., Shin, S.S., Solano-Gallego, L., Straubinger, R.K., Tasker, S., Traub, R., Wright, I., Bowman, D.D., Gradoni, L., Otranto, D., 2019. Canine leishmaniasis control in the context of one health. *Emerg. Infect. Dis.* 25, E1–E4. <https://doi.org/10.3201/eid2512.190164>
- do Vale, B., Lopes, A.P., Fontes, M. da C., Silvestre, M., Cardoso, L., Coelho, A.C., 2021. Bats, pangolins, minks and other animals - villains or victims of SARS-CoV-2? *Vet. Res. Commun.* 45. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09787-2>
- Freitas, J.C.C. de, Filho, A.P.S., Santos, G.J.L., Lima, A.L., Nunes-Pinheiro, D.C.S., 2013.

- Analysis of Seasonality, Tendencies and Correlations in Human and Canine Visceral Leishmaniasis. *Acta Sci. Vet.* 41, 1151.
- Governo do Estado do Ceará, 2018. Boletim Epidemiológico: Leishmaniose Visceral.
- IBGE, 2021. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ce/fortaleza/panoramaVL>.
- IPECE – Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará, 2018. Perfil Municipal de Fortaleza - 2017. Inst. Pesqui. e Estratégia Econômica do Ceará.
- Leal, G.G. de A., Carneiro, M., Pinheiro, A. da C., Marques, L.A., Ker, H.G., Reis, A.B., Coura-Vital, W., 2018. Risk profile for Leishmania infection in dogs coming from an area of visceral leishmaniasis reemergence. *Prev. Vet. Med.* 150, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.11.022>
- Lima, Á.L.M., de Lima, I.D., Coutinho, J.F.V., de Sousa, Ú.P.S.T., Rodrigues, M.A.G., Wilson, M.E., Pearson, R.D., Queiroz, J.W., Jerônimo, S.M.B., 2017. Changing epidemiology of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil: A 25-year follow-up of an urban outbreak. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 111, 440–447. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trx080>
- Lina, T.T., Luo, T., Velayutham, T., Das, S., McBride, J.W., 2017. Ehrlichia Activation of Wnt-PI3K-mTOR Signaling Inhibits Autolysosome Generation and Autophagic Destruction by the Mononuclear Phagocyte. *Infect. Immun.* 85, 1–17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00690-17>
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Breitschwerdt, E.B., 2009. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends Parasitol.* 25, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.01.003>
- Rikihisa, Y., 2010. Molecular events involved in cellular invasion by Ehrlichia chaffeensis and Anaplasma phagocytophilum. *Vet. Parasitol.* 167, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.017>

7 CAPÍTULO II

Diagnosis of canine ehrlichiosis in the day-to-day of the veterinary clinic

[Diagnóstico da erliquiose canina no dia-a-dia da clínica veterinária]

Submetido ao Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Diagnosis of canine ehrlichiosis in the day-to-day of the veterinary clinic

[*Diagnóstico da erliquiose canina no dia-a-dia da clínica veterinária*]

A. Leal-Lima¹ <https://orcid.org/0000-0002-1926-8037>, A.L.A. Menezes²
<https://orcid.org/0000-0002-7903-0194>, A.J. Toepp^{3,4} <https://orcid.org/0000-0002-0432-5780>,
 F.A.S. Rocha², T.M.V. Ferreira¹ <https://orcid.org/0000-0001-7225-3021>, J.C.C. Freitas⁵
<https://orcid.org/0000-0001-7600-4102>, M.V. Ozanne⁶ <https://orcid.org/0000-0001-5020-8529>, C.A. Petersen⁷ <https://orcid.org/0000-0002-7285-4254>, D.C.S. Nunes-Pinheiro¹
<https://orcid.org/0000-0002-4505-9941>

¹Veterinary Science Pos-Graduate Program - Ceará State University - Fortaleza, CE, Brazil

²Companion Animal Veterinary Practitioner - Fortaleza, CE, Brazil

³EVMS-Sentara Healthcare Analytics and Delivery Science Institute, Norfolk, VA, USA

⁴Department of Internal Medicine - Eastern Virginia Medical School - Norfolk, VA, USA

⁵Laboratório de Diagnóstico - Fortaleza, CE, Brazil

⁶Department of Mathematics & Statistics - Mount Holyoke College - South Hadley, MA,
 USA

⁷Center for Emerging Infectious Diseases - Department of Epidemiology - University of Iowa
 - Iowa City, IA, USA

ABSTRACT

This study compares the performance of four diagnostic methods used to identify canine monocytic ehrlichiosis (CME): bone marrow cytology (BMC), whole blood PCR (PCR), platelet count (PC) and immunochromatographic Erliquiose Ac Test Kit (Alere®) via latent class analysis (LCA) to inform clinician decision making. A total of 52 dogs were tested for CME. BMC was able to detect CME with 100% sensitivity and specificity while PC had low reliability. PCR sensitivity was 100% but low specificity, 64%. Alere had moderate sensitivity (81%) and specificity (78%). These results show Alere is a practical diagnostic test where there is limited laboratory space/equipment. In endemic regions Alere can be an affordable diagnostic for annual checkups and beneficial in confirming highly suspicious CME dogs in combination with BMC and/or when PCR is negative or unavailable. PCR and BMC use are recommended if CME is suspected and there are clinical signs/laboratorial alterations or after travel to an endemic area. Complete blood count, including PC, are an advantageous laboratory tests to support the suspicion of CME and monitor clinical treatment, but should not be use as a confirmatory diagnostic test.

Keywords: *Ehrlichia canis*, bone marrow cytology, platelet count, polymerase chain reaction, immunochromatography test

RESUMO

Este estudo compara a performance de quatro técnicas usadas para identificar erliquiose monocítica canina (CME): citologia de medula óssea (BMC), PCR de sangue periférico (PCR), contagem de plaquetas (PC) e teste imunocromatográfico Erliquiose Ac Test Kit (Alere®) via análise de classe latente (LCA) para informar os clínicos sobre tomadas de decisão. Um total de 52 cães foram testados para CME. BMC foi capaz de detectar CME com 100% de sensibilidade e especificidade enquanto PC teve baixa confiabilidade. Sensibilidade da PCR foi 100%, mas com baixa especificidade de 64%. Alere teve moderada sensibilidade (81%) e especificidade (78%). Esses resultados mostram que Alere é um teste de diagnóstico prático quando equipamento laboratorial é limitado. Alere pode ser usado como diagnóstico acessível para verificação anual e vantajoso para confirmar cães com alta suspeita de CME em combinação com BMC e/ou quando PCR for negativo ou inacessível. PCR e BMC são recomendados na suspeita de CME com alterações clínicas/laboratoriais ou após viagens para áreas endêmicas. A contagem de plaquetas, é um teste laboratorial útil para suportar a

suspeita de CME e monitorar o tratamento, mas não deve ser usado como um teste de diagnóstico confirmatório.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*, citologia de medula óssea, contagem de plaquetas, reação em cadeia da polimerase, teste imunocromatográfico

INTRODUCTION

Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) is endemic in Brazil. This disease is caused by the pleomorphic, Gram negative, obligate intracellular bacteria *Ehrlichia canis*, which has tropism for phagocytic mononuclear cells (Buhles *et al.*, 1974; Salje, 2021). Prevalence of CME in Brazil varied from 4-75% (Vieira *et al.*, 2011) and is transmitted via the arthropod vector *Rhipicephalus sanguineus*, commonly known as the brown dog tick (Dantas-Torres *et al.*, 2018).

CME kills dogs and remains a human public health risk due to the disease's zoonotic potential (Bouza-Mora *et al.*, 2017). Molecular detection of *E. canis* in humans characterized by fever and myalgia has been reported in Venezuela, underscoring the zoonotic potential of this bacteria (Bouza-Mora *et al.*, 2017). Additionally, it has been shown to increase the likelihood of progression of other comorbidities such as canine leishmaniosis and babesiosis making early identification and treatment imperative to reduce mortality and morbidity among infected dogs (Toepp *et al.*, 2019).

There are three main presentations of CME: acute, subclinical, and chronic. Acute and chronic stages of disease are characterized by non-specific signs including fever, alopecia, emesis, apathy, inappetence, lymphadenomegaly, hepatosplenomegaly and mucous membrane pallor making diagnosis and staging difficult. Chronic disease is characterized by hemorrhagic diathesis (epistaxis, petechiae, melena), pancytopenia, and therapeutic response failure followed by death (Moreira *et al.*, 2003; Mylonakis *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2015) but these signs are also common during other canine diseases such as leishmaniosis. Subclinical disease can persist for weeks or years, evolving to a chronic disease. In this stage of infection, thrombocytopenia is commonly detected with high antibodies titers (Harrus and Waner, 2011).

Clinical management, treatment and control of CME are important as a One-Health concern in endemic countries (Saito and Walker, 2016) especially given the expanded distribution of tick vectors (Gray *et al.*, 2013). Current diagnostic methods for CME have

multiple difficulties (Irwin, 2014). Performance of these diagnostics require costly laboratory equipment or facilities. In endemic areas practitioners rely on clinical signs and thrombocytopenia to diagnose disease, but these non-specific clinical signs present challenges to accurate treatment and diagnosis (Fonseca *et al.*, 2017; Ueno *et al.*, 2009). The current confirmatory method for CME is identification of bacterial morulae inside monocytes in blood or bone marrow smear, which has better accuracy in the acute CME stage, but has low overall sensitivity ranging from 4-60% depending on the pathologist and can be confused with *Anaplasma phagocytophilum* when observed in neutrophils (Mylonakis *et al.*, 2003; Borin *et al.*, 2009; Ueno *et al.*, 2009; Aguiar *et al.*, 2020). In chronic and subclinical stages, serological tests such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescence antibody test (IFAT) are recommended, but cured dogs can be seropositive for months (Rikihiya, 2011).

Polymerase chain reaction (PCR) can be used as a molecular method to detect the genetic material of hemoparasites; this is recommended in acute and chronic phases of CME when *E. canis* are more abundant in the bloodstream (Harrus and Waner, 2011; Ueno *et al.*, 2009). For many years, since CME was first described as Tropical Canine Pancytopenia, IFAT was used as the gold standard diagnostic (Ristic *et al.*, 1972). Currently, scientists prefer to recommend PCR as reliable method, because of the test's ability to detect bacterial DNA vs evidence of exposure via antibodies (Dantas-Torres *et al.*, 2018). In a study (Makino *et al.*, 2015) only 22% of PCR positive dogs for *E. canis* were positive in both buffy coat and bone marrow. On the other hand, PCR is impractically expensive and slow for most practitioners. Additionally, PCR performance is variable based on sample type: peripheral blood, bone marrow aspirate, tissue, skin, etc.

CME confirmatory diagnostics have several limitations due to the nature of disease presentation and bacterial behavior. To date no study has compared these diagnostic tests in a real-world setting using Latent Class Analysis (LCA). In cases, where no gold standard is accepted to assess sensitivity and specificity a statistical method, LCA, can be employed to establish a fair comparison between tests (Rindskopf, 2011). This study aims to compare the performance (sensitivity and specificity) of four diagnostic methods used to identify CME: bone marrow cytology (BMC), bloodstream PCR (PCR), platelet count (PC), immunochromatographic Erliquiose Ac Test Kit (Alere®) via LCA and to determine practical guidelines for practitioners for the diagnosis of CME in endemic regions where laboratory equipment, time, and finances are limited.

MATERIALS AND METHODS

Forty-four dogs (n=44) from the Fortaleza Municipal Zoonosis Control Center (ZCC). These dogs were selected by convenience regardless of the reason they were at ZCC and clinical status. Another eight (n=8) dogs without clinical or laboratorial alterations from private owners were enrolled in this study and were considered healthy to improve the model analysis with negative diagnostic tests. This study was approved by the Ceará State University Ethical Committee for Animal Use (CEUA-UECE) under protocol number 6508268/2016.

Blood samples were acquired by venipuncture into tubes with anticoagulant (Ethylenediaminetetraacetic acid - EDTA). Whole blood was used for PC using an automatized veterinary hemocytometer (BC-2800Vet Mindray®, Shenzhen, China). For dichotomous analyses, PC values were converted into positive when values were below 186,000 / μ L and negative when at or above that threshold. This value was based on the normal PC for the species reference 186,000-545,000 / μ L (Stokol, 2010).

Bone marrow collection was performed with a sterile needle from the femoral trochanter. Upon extraction, materials were placed on a glass slide and the smear stained via Fast Hematology Kit (Laborclin®, Pinhais, Paraná Brazil). Smears were observed at optical microscope (1000x; ZEISS®) by a veterinary pathologist. When a characteristic *Ehrlichia* spp. morula was observed into the cell, monocytes or macrophages, the result was recorded as positive.

Alere tests were performed using manufacturer instructions (<http://alerevet.com.br/Erliquiose.html>). 10 μ L of whole blood sample is poured to the well on the device then added two drops of buffer. Results were reported categorically as positive or negative.

Whole blood was used for PCR. DNA was extracted using QIAGEN DNeasy Blood & Tissue kit according to manufacturer's instructions (Qiagen, Valencia, California, USA). An oligonucleotide for the 16S rRNA gene of *Erhlichia* spp. was selected from conserved area across the following referenced sequences and their respective access numbers: *E. canis* (AF162860), *E. canis* Japan (AF536827), *E. ewingii* (U96436), *Anaplasma platys* (AF1567844), *E. chaffeensis* (U86665), *Anaplasma phagocytophila* (U02521), *E. bovis* (AF294789), *Neorickettsia risticii* (M21290). Sequence alignment was performed using the Clustal W method, using the Megalign program (LaserGeneDNAStar Inc.®, Madison, Wisconsin USA).

Oligonucleotide were evaluated for similarity with GenBank sequences, using the BLAST-N® algorithm (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotides). After confirming

the identity for the genus, the sequence was synthesized (Prodimol IDT®, Belo Horizonte, MG, Brazil) under the designation Ebr6 (5'-CGA ACG CTG GCG GCA AG-3'). This oligonucleotide was used in combination with the gender-specific reverse oligonucleotide Ebr5 (5'-GGA GTG CTT AAC GCG TTA G-3'), according to Duarte *et al.* (2013).

PCR assays were performed with duplicate samples using 25 µL DNA 22 µL of Master Mix (Quatro G®), forward primer Ebr6 (0.5 µL), reverse primer Ebr5 (0.5 µL) and genomic DNA (2 µL). PCR amplification was performed with initial denaturation at 94°C for 5 minutes, 35 cycles with denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 53°C for 30 seconds and extension at 72°C for 1 minute: and final extension at 72°C for 10 minutes, with maintenance temperature at 4°C. A reference genomic DNA sample for *E. canis* was used as positive control for the reactions (Prodimol IDT®, Belo Horizonte, MG, Brazil). The 364-bp amplification products were visualized in a 2% agarose gel (Agarose NA, Amersham Biosciences®).

Results were recorded as categorical values positive and negative for each test PC, BMC, Alere and PCR. To assess the level of agreement between tests, Cohen's kappa and Light's kappa were calculated (Light, 1971). LCA was used to determinate a gold standard to calculate sensitivity and specificity for all tests used (Rindskopf, 2011). PC is not a diagnostic test but is consistently used as one by clinicians in the field and thus was included in our kappa calculation and LCA analysis.

Observed agreement (OA) between two tests was calculated by the number of concordant results divided by the number of animals (52). Light's kappa, which generalizes Cohen's kappa and is typically used to calculate test agreement among more than two diagnostic tests, was calculated using the *irr* package within R statistical software (Garmer *et al.*, 2019).

Diagnostic test results were treated as independent, conditional on underlying disease status – conditional independence assumption. A fixed effects latent class model was fit using the *randomLCA* package within R statistical software (Beath, 2017). All statistical analyses were performed using R version 3.6.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

RESULTS

A total of 52 dogs were tested for CME by BMC, Alere, PC and PCR (Tab. 1). PCR found the most dogs positive for *E. canis* (29; 55.8%), followed by the Alere test and platelet count (PC). As none of these tests are officially the gold standard diagnostic methods for

CME, we applied LCA to calculate the sensitivity and specificity of each test based on all entries (Tab. 2).

Table 1. Bone Marrow Cytology (BMC), Immunochromatographic *Ehrlichia canis* Alere® test (Alere), Platelet Count (PC) and Polymerase Chain Reaction (PCR) results for Canine Monocytic Ehrlichiosis (n = 52); positives (+) and negatives (-)

		BMC		Alere		PC		Total
		+	-	+	-	+	-	
PC	+	10	9	13	6	19	0	19
	-	6	27	8	25	0	33	33
Alere	+	13	8	21	0	13	8	21
	-	3	28	0	31	6	25	31
PCR	+	16	13	15	14	13	16	29
	-	0	23	6	17	6	17	23
Total		16	36	21	31	19	33	52

Table 2. Sensitivity and Specificity for Bone Marrow Cytology (BMC), Immunochromatographic *Ehrlichia canis* Alere® test (Alere), Platelet Count (PC) and Polymerase Chain Reaction (PCR) calculated by Latent Class Analysis

Test	Sensitivity	C.I.	Specificity	C.I.
BMC	1.00	*	1.00	**
Alere	0.81	0.51 – 0.95	0.78	0.90 – 0.59
PCR	1.00	*	0.64	0.79 – 0.45
PC	0.63	0.34 – 0.84	0.75	0.88 – 0.56

C.I: Confidence interval.

* Every positive sample was classified as diseased by Latent Class Analysis.

** Every negative sample was classified as not diseased by Latent Class Analysis.

Our results show all positive animals by BMC had an indication of CME, with true positive rate of 1.00, as this technique is based on etiological agent visualization. On the other

hand, PC has inferior specificity as it relies on an indirect alteration, with 63% true positive rate and 25% false positive rate.

The posterior probabilities of having clinical CME (yes / no) given all entries from each test analyzed by LCA were compared (Fig. 1). PCR targets *E. canis* molecular fragments, and some positive animals on this test were categorized by LCA as without CME, as LCA will consider disease given the entries from the four tests, animals in early infection are positive by PCR may not develop clinical CME.

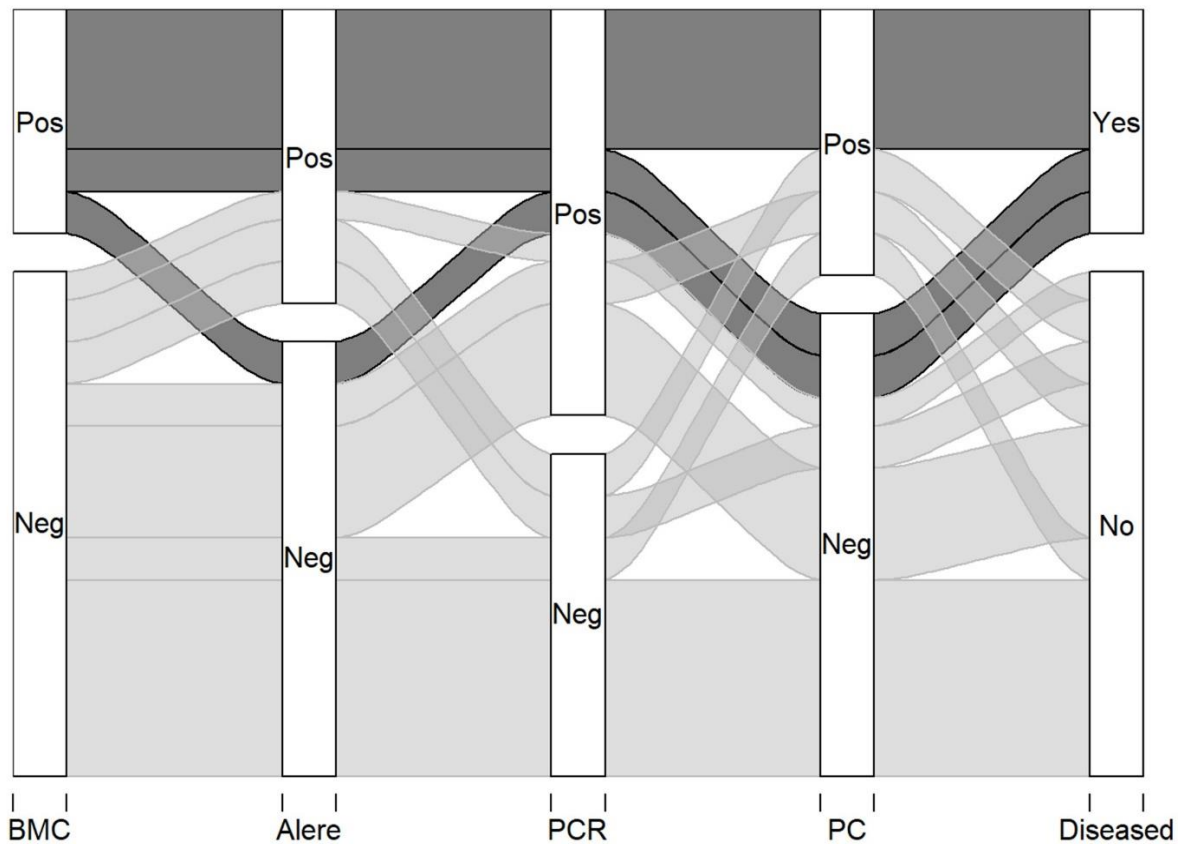


Figure 1. Alluvial diagrams of canine monocytic ehrlichiosis (CME) diagnostic tests positivity and negativity related to diseased calculated by Latent Class Analysis. Animals classified by the latent class analysis as having CME are represented by a dark gray ribbon and healthy animals are represented by the light gray ribbon. Bone Marrow Cytology (BMC), Immunochromatographic *Ehrlichia canis* Alere® test (Alere), Platelet Count (PC) and whole blood Polymerase Chain Reaction (PCR)

Additionally, we calculated Light's Kappa coefficient and it showed a fair agreement with a Kappa value of 0.38 between all tests and an observed agreement (OA) of 46% (Tab. 3). Furthermore, we calculated Kappa without PC, as it is not formally a diagnostic test, and it improved from fair to moderate agreement (0.44) and OA from 46% to 58% (Table 3). Comparing tests pairwise, the highest OA was obtained by Alere vs. BMC, with 41/52 (79%)

concordant results, followed by PCR vs. BMC with 39/52 (75%) and Alere vs. PC with 38/52 (73%). Kappa coefficients identified moderate agreement between Alere vs. BMC (0.55), BMC vs. PCR (0.52) and Alere vs. PC (0.44), a fair agreement between BMC vs. PC (0.36) and PCR vs. Alere (0.25) and a slight agreement between PC and PCR (0.18).

DISCUSSION

Our data shows CME is endemic in Fortaleza-CE, Brazil with positivity ranging between 31-56% depending on the diagnostic method applied. Diagnostic methods tested had a fair agreement calculated by Light's Kappa statistic, indicating that proper CME diagnosis requires multiple diagnostic tests with clinical awareness to choose the right combination of tests (Fig. 2). Additionally, tests with different biological targets had low agreement compared pairwise, which corroborates with the use of LCA instead of using one test as the gold standard.

Table 3. Agreement between Canine Monocytic Ehrlichiosis tests: Bone Marrow Cytology (BMC), Immunochromatographic *Ehrlichia canis* Alere® test (Alere), Platelet Count (PC), and Polymerase Chain Reaction (PCR) calculated by Kappa agreement

	Including PC	Excluding PC
Kappa	0.38	0.44
Classification	Fair	Moderate
Z (Kappa)	0.815	2.42
P value	0.415	0.015
Observed Agreement (%)	46%	58%

We used a moderate sample size of naturally infected dogs in unknown clinical stage of CME and improved statistical methodology to assess how PC, BMC, peripheral blood PCR and Alere serological test performed in identifying dogs with active disease, that is different than detecting infection, and closer to practitioner routine. Although calculated BMC true positive rate of 1.00 and 0.00 false positive rate (perfect accuracy), it should not be considered a perfect test, since LCA is a statistical model and does not account biological behavior of the

etiological agent. Moreover, imperfect results (accuracy below 100%) should be expected from a different data set.

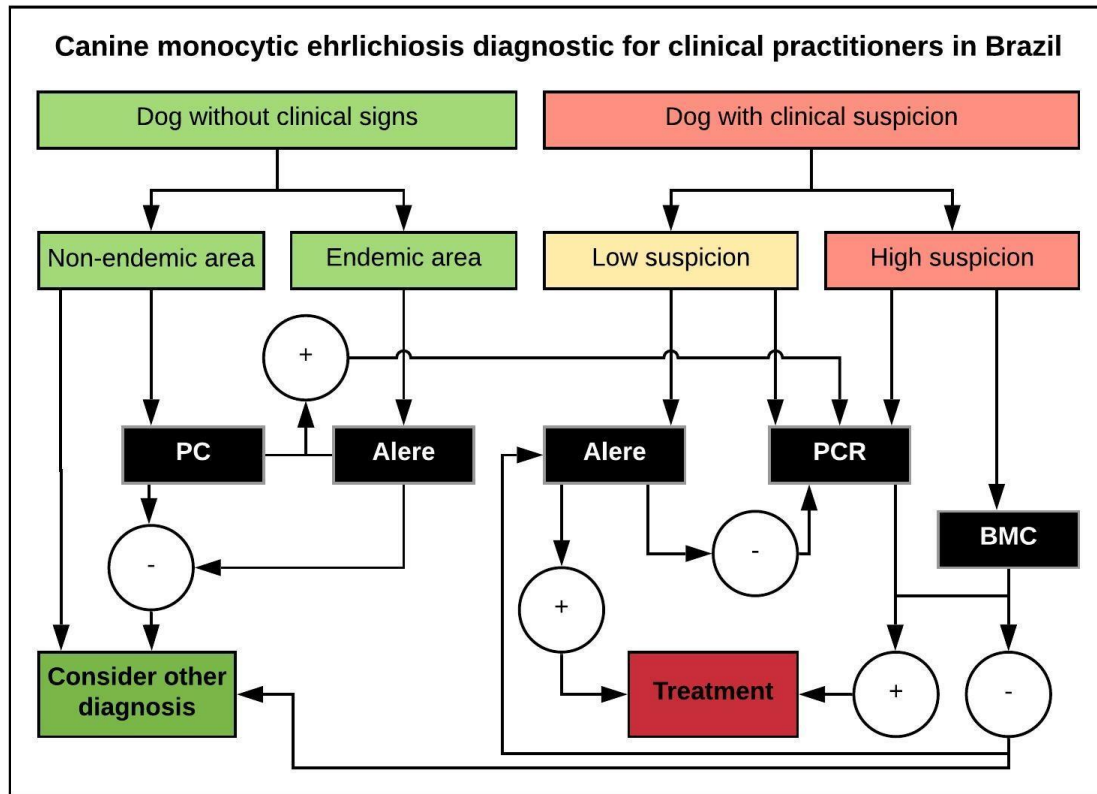


Figure 2. Flowchart suggesting how to conduct clinical diagnostic of canine monocytic ehrlichiosis (CME). Dogs in non-endemic areas without clinical/laboratorial signs should consider other diagnosis. Dogs in endemic areas without clinical signs should use a practical test with fast result as routine and check the positive results with a confirmatory test. Dogs with high suspicion can do a confirmatory test first. Dogs with mild clinical signs in endemic areas, with low suspicion can go to a reliable PCR if feasible or a fastest method but confirm both negative results.

As shown in our results, practitioners that rely only on hematological parameters and clinical signs to detect CME are in high probability of error since PC has low accuracy to detect disease with sensitivity of 63% and specificity of 75% (Tab. 2). Studies have shown dogs positive for *E. canis* can have normal PC and coagulation (Xavier *et al.*, 2009). Although PC should not be performed as a diagnostic test, it is essential for practitioners to investigate *E. canis* infection in dogs with epistaxis and thrombocytopenia and use PC to monitor clinical improvement (Lukács *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021).

In our tests, BMC and PCR performed perfectly in detecting diseased animals. Ergo

these tests are recommended when clinical suspicion is CME, with clinical signs and laboratorial alterations compatible with acute phase. Our data shows PCR sensitivity of 100% but with a low specificity of 64%. These numbers were calculated by LCA and report probability of detecting disease and not infection. Thus, PCR appears to have a low specificity but rather may detect infection before development of CME disease. PCR is therefore recommended in conjunction with recent tick bite(s) (0-7 days) or for identification of CME acute phase, characterized by high bacteremia, and reinforce that PCR is the definitive confirmatory test (Harrus and Waner, 2011), but has practical drawbacks; time to test results, availability, and cost. Nevertheless, negative results particularly in the context of potential chronic disease must be interpreted with caution, for example one retrospective study detected *E. canis* DNA in only 13/19 dogs with chronic CME (Mylonakis *et al.*, 2004).

Alere is a practical in-clinic solution with fast results and low cost compared to PCR. This test performed moderately well with sensitivity of 81% and specificity of 78% (Tab. 3). Recommendation of Alere as screening test in endemic areas, in suspicion of subclinical CME where bacteremia should be lower or inexistent, when PCR is unavailable, or as a confirmatory test with negative PCR and BMC in a high CME suspicion (Fig. 2).

Further research needs to be conducted to assess the staging ability of these diagnostics. A prospective experimental study with a determined time of infection is recommended but is highly costly demanding and ethically debatable. Our study is limited given the number of diagnostic tests used. Adding more methods, such as real time PCR, IFAT, ELISA and bone marrow immunohistochemistry would benefit LCA analyses and improve accuracy of the results shown.

CONCLUSION

Exposed above, CME diagnostic can be erroneous if the right combination of techniques is not used. Here we suggest using screening tests such as Alere in endemic regions for annual checkup and to confirm highly suspicious CME dogs with negative BMC and/or PCR or when unavailable. PCR and BMC use are recommended in suspicious CME dogs in endemic areas, dogs with clinical signs, laboratorial alterations or after traveled to an endemic area. Regardless of which combination of tests the clinical veterinarian uses, complete blood count, including PC, is needed as a laboratorial exam to support the suspicion of CME and monitor clinical treatment, but should not be carried out alone as a confirmatory diagnostic test.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Cearense de Apoio a Pesquisa (Funcap), Vertrauen Diagnosis, Alere Inc, Universidade Estadual do Ceará, The University of Iowa, Sentara Healthcare Analytics and Delivery Science Institute, Eastern Virginia Medical School, and Mount Holyoke College for their support and trust.

REFERENCES

- AGUIAR, D.M.; RODRIGUES, F.P.; RIBEIRO, M.G. *et al.* Uncommon *Ehrlichia canis* infection associated with morulae in neutrophils from naturally infected dogs in Brazil. *Transbound Emerg. Dis.*, v.67, p.135S-141S, 2020.
- BEATH, K.J. randomLCA: An R package for latent class with random effects analysis. *J. Stat. Softw.*, v.81, p.1-25 2017.
- BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z.; FERREIRA, F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, p.566-571, 2009.
- BOUZA-MORA, L.; DOLZ, G.; SOLÓRZANO-MORALES, A. *et al.* Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. *Ticks Tick Borne Dis.*, v.8, p.36-40, 2017.
- BUHLES, W.C.; HUXSOLL, D.L.Jr.; RISTIC, M. Tropical canine pancytopenia: Clinical, hematologic and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy and challenge inoculation. *J. Infect. Dis.*, v.130, p.357-367, 1974.
- DANTAS-TORRES, F.; SILVA, Y.Y.; MIRANDA, D.E.O. *et al.* *Ehrlichia* spp. infection in rural dogs from remote indigenous villages in north-eastern Brazil. *Parasit. Vectors*, v.11, p.4-9, 2018.
- DUARTE, S.C.; PARENTE, J.A.; LINHARES, G.F. Diagnóstico molecular de *Ehrlichia canis* em cães de Goiânia, Brasil. *Rev. Patol. Trop.*, v.42, p.30-41, 2013.
- FONSECA, J.P.; BRUHN, F.R.P.; RIBEIRO, M.J.M. *et al.* Hematological parameters and seroprevalence of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs. *Cien. Ani. Bras.*, v.18, p.1-9, 2017.

- GARMER, M.; LEMON, J.; SINGH, P. Various coefficients of interrater reliability and agreement. Package 'irr', Version 0.84.1. 2019.
- GRAY, J.; DANTAS-TORRES, F.; ESTRADA-PEÑA, A.; LEVIN, M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks Tick Borne Dis.*, v. 4, p.171-180, 2013.
- HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *Vet. J.*, v.187, p.292-296, 2011.
- IRWIN, P.J. It shouldn't happen to a dog . . . or a veterinarian: Clinical paradigms for canine vector-borne diseases. *Trends in Parasitol.*, v.30, p.104-112, 2014.
- LIGHT, R.J. Measures of response agreement for qualitative data: Some generalizations and alternatives. *Psychological Bull.*, v.76, p.365-377, 1971.
- LIMA, A.L.; SANTOS, G.J.L.; ROATT, B.M. *et al.* Serum TNF- α and IL-10 in *Ehrlichia* spp. naturally infected dogs. *Acta Sci. Vet.*, v.43, p.1-7, 2015.
- LUKÁCS, R.M.; PETERS, L.R.; EMINAGA, S.; BUCKERIDGE, D.M. *Ehrlichia canis* infection in the cerebrospinal fluid of a dog characterized by morulae within monocytes and neutrophils. *Vet. Clin. Pathol.*, v.49, p.1-6, 2020.
- MAKINO, H.; SOUSA, V.R.F.; FUJIMORI, M. *et al.* *Ehrlichia canis* detection in dogs from Várzea Grande: a comparative analysis of blood and bone marrow samples. *Cien Rural*, v.46, p.310-314, 2015.
- MOREIRA, S.M.; BASTOS, C.V., ARAÚJO, R.B. *et al.* Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, p.141-147, 2003.
- MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C. *et al.* Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A comparison between five methods. *Vet. Microbiol.*, v.91, p.197-204, 2003.
- MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BREITSCHWERDT, E.B. *et al.* Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A retrospective study of 19 natural cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.40, p.174-184, 2004.

- RIKIHISA, Y. Diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis: Development of advanced techniques to combat a global disease. *Vet. J.*, v.187, p.285-286, 2011.
- RINDSKOPF, D. The use of latent class analysis in medical diagnosis. In: Bhattacharjee, M.; DHAR, S. K.; SUBRAMANIAN, S. Series in Biostatistics – Recent Advances in biostatistics. Singapore : World Scientific, 2011. Part III, p.257-270, 2011.
- RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L.; WEISIGER, R.M. *et al.* Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. *Infect. Immun.*, v.6, p.226-231, 1972.
- SAITO, T.; WALKER, D. Ehrlichioses: An important one health opportunity. *Vet. Sci.*, v.3, p.01-17, 2016.
- SALJE, J. Cells within cells: Rickettsiales and the obligate intracellular bacterial lifestyle. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 19, p.375-390, 2021.
- SILVA, A. C. T.; SANTOS, J. R. S.; SILVA, R. M. N. *et al.* Prednisolone associated with doxycycline on the hematological parameters and serum proteinogram of dogs with ehrlichiosis. *Cienc. Rural*, v.51, p1-9, 2021.
- STOKOL, T. Essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis. In: Weiss, D. J.; Wardrop, K. J. Schalm's Veterinary Hematology. Singapore : Blackwell Publishing Ltd, 6th ed. 2010. Cap. 80, p. 606.
- TOEPP, A.J.; MONTEIRO, G.R.G.; COUTINHO, J.F.V. *et al.* Comorbid infections induce progression of visceral leishmaniasis. *Parasit. Vectors*, v.12, p.54-66, 2019.
- UENO, T.E.H.; AGUIAR, D.M.; PACHECO, R.C. *et al.* *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.18, p.57-61, 2009.
- VIEIRA, R.F.D.C.; BIONDO, A.W.; GUIMARÃES, A.M.S. *et al.* Ehrlichiosis in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.20, p.1-12, 2011.
- XAVIER, M.S.; ALMOSNY, N.R.P.; NASCIMENTO, G.V.O. *et al.* Avaliação da coagulação plasmática e plaquetometria em cães não infectados e infectados experimentalmente com *Ehrlichia* spp. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, p.1049-1053, 2009.

8 CAPÍTULO III

**Successful treatment and management of canine ehrlichiosis-leishmaniosis-heart worm
comorbidity**

Acta Scientiae Veterinariae

DOI: 10.22456/1679-9216.113295



Successful Treatment and Management of Canine Ehrlichiosis-Leishmaniosis-Heartworm Comorbidity

Adam Leal-

Lima¹, Tiago Cunha Ferreira¹, Társsila Mara Vieira Ferreira¹, Pedro Covas Coelho² & Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro¹

ABSTRACT

Background: Canine vector-borne diseases (CVBD) are common in tropical countries where the climate favors arthropods abundance. Comorbidity with one or more CVBD are reported as clinical complication and worsen prognosis. Canine visceral leishmaniosis (CanL) is an endemic zoonotic disease in Brazil caused by *Leishmania infantum*, with several restrictions to canine treatment and suggestion of reservoir euthanasia for disease control. Heartworm (HW) is a helminthic

disease caused by *Dirofilaria immitis* infection in dogs. It is a chronic heart disease, which can lead to death by congestive heart failure. Canine ehrlichiosis (CE) is caused by *Ehrlichia canis* bacterial infection with a zoonotic potential and fatal to dogs in acute and chronic presentations. Exposed to the above, this study aims to describe a successful treatment and management of a dog with CanL, CE, and HW comorbidity.

Case: A 3-year-old male uncastrated black Labrador dog, weighing 35 kg, was admitted to the veterinary clinic due to immunochromatographic CanL positive test performed by municipal zoonosis control center active surveillance. Clinical exam showed a mild shedding, intermittent eye white/yellow discharge and popliteal lymph nodes enlargement. After positive for CanL, veterinary requested more laboratorial exams. IFAT and ELISA were positive for CanL, blood smear showed presence of microfilaria, and bone marrow cytology showed *Ehrlichia* spp. morulae and microfilaria. Initial treatment

prescribed was oral doxycycline, omeprazole, ranitidine, and domperidone for 30 days, and allopurinol and ivermectin

until further recommendation. Additionally, repellent collar, repellent spray and vitamin supplement was indicated. After

first month, marbofloxacin for 30 days and three doses of immunostimulant drug were administered. After three months of treatment, dog still positive for heartworm, ehrlichiosis, and CanL. Doxycycline protocol was repeated. Dog became consistently negative for all pathogens one year later with persistent thrombocytopenia but without clinical signs, ergo allopurinol and ivermectin were discontinued. After 4 years of follow up, the animal had an acute pancreatitis and died, with unremarkable total blood count and negative for all pathogens.

Discussion: CVBD coinfections are commonly reported as worsen prognosis in endemic regions.

The pathogens reported here share a host immunomodulation competence. *L. infantum* and *Ehrlichia* spp. downregulates Th1 response, whereas *D. immitis* increase as Th2 profile. The therapeutic protocol was initiated by staging CanL. Since the patient had clinical signs, allopurinol was prescribed as a well-established drug for CanL. Marbofloxacin was added due to its high safety drug in clinical improvement of infected dogs with and without renal disease and *in vitro* effectiveness against *L. infantum*. Domperidone was used to promote Th1 cytokine profile as INF- γ , IL-2, IL-12, and TNF- α . We used an immunostimulant protocol to favor polarization to the Th1 profile comprised by 30 days of domperidone protocol followed by a vaccine and an immunomodulator. Doxycycline was used successfully for *Ehrlichia* spp. and HE clearance after 2 treatment courses and 1 year of ivermectin every 15 days. The animal presented intermittent coughing episodes on the first treatment course, but no medical intervention was needed besides exercise restriction. Our report shows the successful management of one dog with CanL, CE and HE comorbidity. This success was possible due to early detection and good therapeutic choice.

Keywords: canine visceral leishmaniosis, coinfection, *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Leishmania infantum*, treatment.

INTRODUCTION

Canine visceral leishmaniosis (CanL), ehrlichiosis (CE) and heartworm (HW) are examples of canine vector-borne diseases (CVBD) endemic in Brazil [4,13,27]. Comorbidity is related to worsen prognosis, thus early diagnostic is crucial to avoid critical illness [2,31].

Dogs with CanL or CE can be apparently healthy or present a broad of alterations including dermatitis, emesis, lymph nodes enlargement, and conjunctivitis. They are caused by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis* infection, transmitted by *Lutzomyia longipalpis* sandfly and by *Rhipicephalus sanguineus* tick respectively [18,28].

Treatment of CanL needs assorting stage accordingly, since animals in early stages have good prognosis [6,28]. Additionally, dogs without clinical signs are related to lower transmission of the parasite to the vector [15]. Doxycycline is recommended to treat CE, it is efficient in clinical signs remission but can be repeated to clear infection [18,34].

Canine HW is caused by *Dirofilaria immitis* nematodes and transmitted by mosquito species, including *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* [9,29]. The adult worms parasitize pulmonary arteries and right heart chambers. Disease presentation will depend on parasite load, normally dogs remain without clinical signs with detectable microfilaria on blood smear, but cough and exercise intolerance can be observed [5]. Alternative slow killing treatment with macrocyclic lactone and doxycycline are reported [3,16].

These 3 CVBD cited can have silent infection or severe chronic diseases presentation. Therefore, the aim of this case report is to describe a successful treatment and management of a dog with CanL, CE, and HW comorbidity.

CASE

A 3-year-old male uncastrated black Labrador dog, weighing 35 kg, was admitted to the veterinary clinic due to immunochromatographic CanL positive test¹ (Dual Path Plataform®) performed by municipal zoonosis control center active surveillance in August 2014. Thereafter, dog was positive for CanL on IFAT (1:80), and ELISA, and for Ehrlichia spp. morulae and microfilaria on bone marrow cytology. Clinical exam showed a mild hair loss, popliteal lymph nodes enlargement, hyperemia mucous membranes, and intermittent eye discharge. Nonetheless the animal was active, normal temperature, and appetite. Total blood count, sera levels of creatinine, urea, and alanine aminotransferase were unremarkable, but microfilaria was observed on blood smear (Table 1 and Table 2).

An Ehrlichia spp. infection was reported one year before (2013), but no confirmatory diagnostic was done previously or after treatment. At the time, emesis, lack of appetites, alopecia, lymph node enlargement, and fever were detected on clinical exam. Dog was treated with intramuscular tetracycline injections for 21 days. Diagnostic and clinical management was done monitoring clinical improvement, platelet morphology and count (Table 1). Treatment was finished and the dog was healthy until August 2014.



Figure 1. Picture of the dog in August 2014 showing hyperemic mucous membranes and mild alopecia.

Initial treatment prescribed was oral doxycycline² [Doxitrat® - 10 mg/kg, VO, SID for 28 days] for HW and CE. Omeprazole³ [Medley® - 1 mg/kg, VO, SID for 35 days] and ranitidine³ [Medley® - 2 mg/kg, VO, BID for 30 days] were administered to avoid gastritis,

and ivermectin² [Mectimax® - 6 µg/kg, VO, once every 15 days until clearance of *D. immitis*].

No parasitological or laboratorial exams substantiate prescription of leishmanicidal drugs, despite positive in 3 serological tests (Table 2). Therefore, dog was categorized as CanL stage I and therapy was prescribed as follows: domperidone⁴ [EMS® -0.5 mg/kg, VO, SID for 30 days], allopurinol³ [Medley®-10 mg/kg, VO, SID until further recommendation]. Additionally, repellent collar⁵ (Scalibor®), repellent spray⁶ (KarflaeCitronela®), and vitamin supplement⁷(Glicopan Pet®) were indicated. Dog showed intermittent emesis and coughs during this first protocol, even with exercise restriction.

Table 1. Hematological and serological exams (2013-2018) of a 3-year-old male uncastrated black Labrador dog with leishmaniosis, heartworm, and ehrlichiosis comorbidity.

Parameter	Period*													
	Apr 2013	May 2013	Aug 2014	Sep 2014	Oct 2014	Nov 2014	Dez 2014	Feb 2015	Apr 2015	Sep 2015	Jan 2016	May 2016	Oct 2017	Sep 2018
RBC (x10 ⁶ /µL)	4.42	5.09	6.05	7.02	6.08	7.04	6.53	6.08	6.02	6.67	6.46	7.72	6.91	7.72
Hb (g/dL)	10	13.8	15.5	16.1	13.8	16.7	15.1	14.1	13.6	15.5	15.1	17.6	16.2	19.9
Hct (%)	31.1	38	45.3	49.9	43	50.6	45.1	43.8	39.7	47.4	45.8	52.1	46.9	52.9
WBC (x10 ³ /µL)	8.4	18.8	16.9	13.0	19.0	19.2	18.0	19.7	11.0	17.6	19.6	14.6	12.9	16.8
Plt (x10 ³ /uL)	63	128	210	167	196	160	169	108	117	106	163	125	205	576
Plt Mor	GP	GP	n	n	GP	GP	GP	n	GP	n	GP	n	n	n
TPP (g/L)	6.6	7.2	7	7	6.8	7.2	7	7.4	7.2	7.4	7.6	8	8.4	14
Creat. (mg/dL)	-	-	1.2	1.29	-	1.02	-	1.2	0.98	-	-	0.86	-	1.3
BUN (UI/dL)	-	-	50.9	49.0	-	24.0	-	-	-	-	-	-	-	30.0
ALT (UI/L)	-	101	54	56	-	55	-	88	24.1	-	-	329	-	210

*Treatment started at August 2014. RBC: red blood cells; Hb: hemoglobin; Hct: hematocrit; WBC: White blood cells; Plt: Platelet count; PltMor: Platelet morphology; TPP: Total plasma proteins; Creat: serum creatinine; Blood urea nitrogen; ALT: alanine aminotransferase; GP: Giant platelets; n: Normal; -: Non available.

After doxycycline and domperidone protocol (30 days of treatment), marbofloxacin⁸ [Marbopet® - 3 mg/kg VO, SID for 30 days], and 3 subcutaneous doses of commercial immunomodulator⁸ [Infervac®-2 mL] plus CanL vaccine⁸ [Leishtec® - 2 mL] once every 21 days were administrated. During this period, emesis and coughing episodes decreased.

In November 2014 (72 days of treatment), blood and bone marrow smear were negative for microfilaria (Table 2), but platelet count was lower compared to August 2014 and giant platelets were observed (Table 1). Serological tests for heartworm and CanL were positive, and bone marrow smear revealed *Ehrlichia* spp. morulae (Table 2). Thus, doxycycline with omeprazole protocol was repeated in a lower dose [7.5 mg/kg, 1 mg/kg VO, SID for 28 days respectively]. On this second treatment course, dog showed improved exercise tolerance and no emesis. Ivermectin, allopurinol, vitamin supplement, repellent collar, and spray were maintained until September 2015, when serological HW and CanL test were negative (Table 2).

Table 2. Parasitological, serological, and molecular tests (2013-2018) of a 3-year-old male uncastrated black Labrador dog (2013-2018) with leishmaniosis, heartworm, and ehrlichiosis comorbidity

Test	Apr 2013	May 2013	Aug 2014	Sep 2014	Oct 2014	Nov 2014	Dez 2014	Feb 2015	Apr 2015	Sep 2015	Jan 2016	May 2016	Oct 2017	Sep 2018
Blood Smear	n	n	MF	MF	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
DPP®	-	-	Pos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bone Marrow Cyt	-	-	E / MF	-	-	E	-	N	-	-	-	-	-	-
HW S	-	-	-	-	-	Pos	-	Pos	-	N	-	-	-	-
IFAT	-	-	1:80	-	N	1:40	-	N	N	N	N	N	N	N
ELISA	-	-	Pos	-	N	Pos	-	N	N	N	N	N	N	IND
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	N

*Treatment started at August 2014. DPP®: Immunochromatographic Dual Path Platform for *Leishmania infantum*; Bone Marrow Cyt: Bone marrow cytology; HW S: Heart worm serological test; IFAT: Immunofluorescence antibody test for *Leishmania infantum*; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay for *Leishmania infantum*; n: Normal; -: Non available; N: Negative; MF: Microfilaria observed; E: *Ehrlichia* spp.

morulae observed; Pos: positive; IND: indeterminate; PCR: Whole blood polymerase chain reaction for *Leishmania* spp.

After one year of clinical management, dog became consistently negative for all pathogens with persistent thrombocytopenia (Table 1 and 2). From 2015 until 2018, the patient did not show coughing, eye discharge or emesis, with exercise tolerance, appetite and healthy. In September 2018, dog was admitted to the clinic because of a lack of appetite and emesis. Acute pancreatitis was diagnosed by abdominal ultra-sonography causing death of the animal with unremarkable total blood count and negative for all pathogens, including *L. infantum* whole blood PCR (Table 2).

DISCUSSION

This study shows a dog that lived for years after CanL, HW, and CE comorbidity remission after treatment according to the literature. These diseases have severe chronic presentations but favorable prognosis in early diagnosis [6,28].

CVBD coinfections are commonly reported as worsen prognostic in endemic regions, where vectors are abundant allowing higher transmission rates [10,31]. The pathogens reported here share a host immunomodulation competence. *Leishmania infantum* and *Ehrlichia* spp. downregulate Th1 response and macrophages killing effectiveness, by different pathways, resulting in pathogen intracellular survival and replication [14,32]. Hence, a mammal infected by one organism can be more susceptible to infection with the other. *Dirofilaria immitis* can immunomodulate the host by increasing Th2 profile which downregulates Th1 response, favoring an infection by intracellular pathogens, such as *Ehrlichia* spp. and *Leishmania* spp. [17]. On our report, the order of events cannot be established, but certainly these CVBD are favored by climate, vector/pathogen abundance and/or host immunomodulation.

The therapeutic protocol initiated by staging the CanL which the patient can be classified in 4 or 5 stages. According Leishvet [28] and Brasileish group [6], our patient had good prognosis classified as stage I and stage II, respectively. Recommended treatment ranges from scientific neglect to allopurinol, immunotherapy, immunomodulation, and miltefosine [6,28]. Since the patient had clinical signs, allopurinol was prescribed as a well-established drug for CanL. Marbofloxacin was added in therapeutic as an alternative drug for CanL due to its high safety drug in clinical improvement of infected dogs with and without renal disease [22,25]. Furthermore, in vitro effectiveness against *L. infantum* strains was reported [1,11].

Domperidone was used on recommended low- secure dose [0.5 mg/kg, VO, SID, for 30 days] for its results on clinical remission and prevention of CanL. This drug increases prolactin serum level, and this hormone has been related to promote Th1 cytokine profile as INF- γ , IL-2, IL-12, and TNF- α [26,33]. Immunotherapeutic approaches are reported as efficient on preventing disease progression in CanL stages I and II [30]. These protocols are based on switching Treg or Th2 to a Th1 profile, enhancing parasite clearance [23,24]. Here we used an immune stimulant protocol to polarize Th1 patient response comprised by 30 days of domperidone protocol followed by a vaccine with A2 Leishmania antigen conjugated with saponin (Leishtec®), an immunomodulator (Infervac®), with *Escherichia coli* lipopolysaccharide and inactivated cells of *Propionibacterium acnes*. This protocol was repeated annually.

Prognostic of CE and HW is good when detected early and doxycycline is a recommended drug for CE and HW, thus was prescribed on the initial treatment. Doxycycline is efficient for CE in clinical improvement but may not clear infection in one treatment course. Hence, repeating the treatment is suggested before using alternative drug since *Ehrlichia* spp. resistance to tetracycline derivatives was not reported [18]. On our study, prescribed protocol for *Ehrlichia* spp. did not clear the bacterial infection in one course, therefore it was repeated after two months being successful despite lowering the dose.

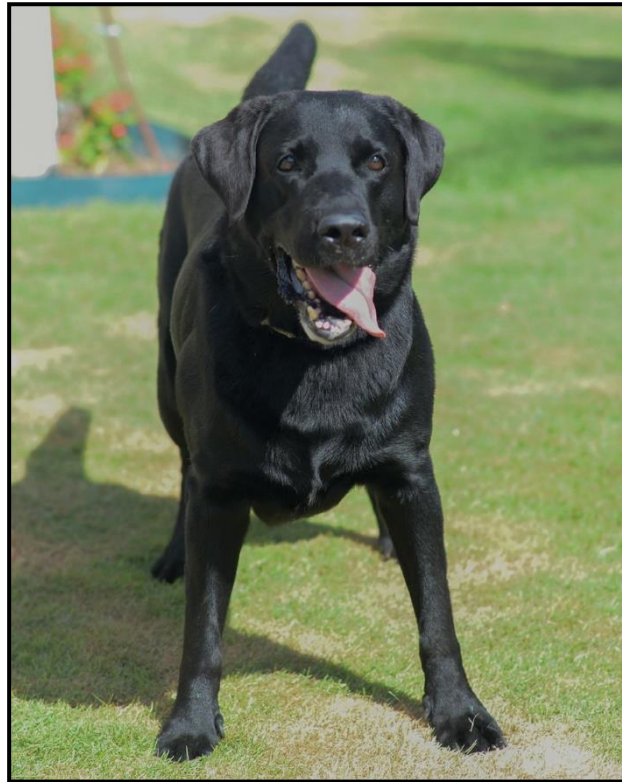


Figure 2. Picture of the dog in December 2017 showing wellness.

A long-term alternative treatment for HW is association of doxycycline with ivermectin [21]. Here we report a patient diagnosed with *D. immitis* by visualization of microfilaria on blood smear (Table 2). Echodopplercardiography was done in September 2014, but no adult worms were visualized. The alternative treatment chosen suggests ivermectin continuous use until seroconversion, since microfilaremia clearance occurs before death of adult worms.

On our case, doxycycline was used successfully for *Ehrlichia* spp. and HE clearance after two treatment courses and one year of ivermectin every 15 days. The animal presented intermittent coughing episodes on the first treatment course, but no medical intervention was needed besides exercise restriction. It is noteworthy the persistent thrombocytopenia after detection and treatment of the comorbidity (Table 1). Low platelet count is reported in *E. canis*, *D. immitis*, and *L. infantum* infection and several mechanisms are described such as immune mediated destruction, dys- function, splenic sequestration via complement binding and vasculitis [7,12,20,27]. The exact mechanism that occurred on this report was not investigated. Regardless of the low platelet count, as the dog became clinically healthy and negative on all tests used, therapeutic intervention with ivermectin or allopurinol were not supported after one year.

Our report shows the successful management of one dog with CanL, CE and HE comorbidity. This success was possible due to early detection and good therapeutic choice. The authors also reinforce the importance of performing differential diagnosis for CVBD in endemic areas, regardless of one infection detected, other pathogens may infect the same animal, and treatment success will depend on commitment of veterinary practitioner to find these pathogens. Additionally, prevent vectors on an infected/suspected animal is ethically fundamental to avoid zoonotic transmission.

MANUFACTURERS

1. Bio-Manguinhos - Fiocruz. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
2. Agener União Saúde Animal. São Paulo, SP, Brazil.
3. Sanofi Medley Farmacêutica Ltda. Suzano, SP, Brazil.
4. EMS Pharma. Hortolândia, SP, Brazil.
5. MSD Saúde Animal. São Paulo, SP, Brazil.
6. Winner Horse. Porto Feliz, SP, Brazil.
7. Vetnil Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda. Louveira, SP, Brazil.
8. Ceva Saúde Animal Ltda. Paulínia, SP, Brazil.

Declaration of interest. The authors declare no conflicts of interest. The authors were responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Amante J.F. dos A.A., Santos A.R., Santos B.M., Mantovan K.B., Joaquim S.F., Latosinski G.S., Menozzi B.D., Hataka A., Lucheis S.B., Venturini J. & Langoni H. 2020. Marbofloxacin induces leishmanicidal activity and less inflammatory response in *Leishmania chagasi* infected macrophages. *Veterinária e Zootecnia*. 27: 1-11.
- 2 Baneth G., Bourdeau P., Bourdoiseau G., Bowman D., Breitschwerdt E., Capelli G., Cardoso L., Dantas-Torres F., Day M., Dedet J.P., G. Dobler, L. Ferrer, P. Irwin, V. Kempf, B. Kohn, M. Lappin, S. Little, Maggi R., Mirá G., Naucke T., Oliva G., Otranto D., Penzhorn B., Pfeffer M., Roura X., Sainz A., Shaw S., Shin S., Solano-Gallego L., Straubinger R., Traub R., Trees A., Truyen U., Demonceau T., Fitzgerald R., Gatti D., Hostetler J., Kilmer B., Krieger K., Mencke

N., Mendão C., Mottier L., Pachnicke S., Rees B., Siebert S., Stanneck D., Tarancán Mingote M., Von Simson C. & Weston S. 2012. Vector-borne diseases - Constant challenge for practicing veterinarians: Recommendations from the CVBD World Forum. *Parasites and Vectors*. 5(1): 2-4.

3 Bazzocchi C., Mortarino M., Grandi G., Kramer L.H., Genchi C., Bandi C., Genchi M., Sacchi L. & McCall J.W. 2008. Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *International Journal for Parasitology*. 38(12): 1401-1410.

4 Bendas A.J.R., Mendes-de-Almeida F., Guerrero J. & Labarthe N. 2017. Atualização sobre a epidemiologia de *dirofilaria immitis* na América do sul e no México: Revisão de literatura. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 54(4): 319-329.

5 Bowman D.D. & Atkins C.E. 2009. Heartworm Biology, Treatment, and Control. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. 39(6): 1127-1158.

6 Brasileish. 2018. Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da Leishmaniose Canina. Disponível em:https://www.brasileish.com.br/assets/files/DIRETRIZES_Brasileish_2.pdf

7 Cortese L., Pelagalli A., Piantedosi D., Mastellone V., Manco A., Lombardi P., Ciaramella P. &Avallone L. 2006. Platelet aggregation and haemostatic response in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*. 53(10): 546-548.

8 Da SilvaA. de C.T., dos Santos J.R.S., da Silva R.M.N., de Santana V.L., Martins F.S. de M., Falcão B.M.R., Tanikawa A., de Almeida T.M., Vaz A.F. de M. & de Souza A.P. 2021. Prednisolone associated with doxycycline on the hematological parameters and serum proteinogram of dogs with ehrlichiosis. *Ciencia Rural*. 51(3): 1–9.

9 Dantas-Torres F. & Otranto D. 2020. Overview on *Dirofilaria immitis* in the Americas, with notes on other filarial worms infecting dogs. *Veterinary Parasitology*. 282(February): 109113.

- 10 De Tommasi A.S., Otranto D., Dantas-Torres F., Capelli G., Breitschwerdt E.B. & Caprariis D. de. 2013.** Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? *Parasites & Vectors*. 6: 97.
- 11 Farca A.M., Miniscalco B., Badino P., Odore R., Monticelli P., Trisciunglio A. & Ferroglia E. 2012.** Canine leishmaniosis: In vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. *Parasitology Research*. 110(6): 2509–2513.
- 12 Harrus S., Waner T., Weiss D.J., Keysary A. & Bark H. 1996.** Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 51(1–2): 13–20.
- 13 Lima A.L., Santos G. J. L., Roatt B.M., Reis A.B., de Freitas J. C. C. & Nunes-Pinheiro D. C. S. 2015.** Serum TNF- α and IL-10 in *Ehrlichia* spp. Naturally Infected Dogs. *Acta Scientiae Veterinariae*. 43(1322): 1–7.
- 14 Lina T.T., Luo T., Velayutham T., Das S. & McBride J.W. 2017.** Ehrlichia Activation of Wnt-PI3K-mTOR Signaling Inhibits Autolysosome Generation and Autophagic Destruction by the Mononuclear Phagocyte. *Infection and Immunity*. 85(12): 1–17.
- 15 Magalhães-Junior J.T., Mota T.F., Porfirio-Passos G., Larangeira D.F., Franke C.R. & Barrouin-Melo S.M. 2016.** Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. *Veterinary Parasitology*. 223: 120–126.
- 16 McCall J.W., Kramer L., Genchi C., Guerrero J., Dzimirski M.T., Mansour A., McCall S.D. & Carson B. 2014.** Effects of doxycycline on heartworm embryogenesis, transmission, circulating microfilaria, and adult worms in microfilaremic dogs. *Veterinary Parasitology*. 206(1–2): 5–13.
- 17 Morchón R., López-Belmonte J., Bazzocchi C., Grandi G., Kramer L. & Simón F. 2007.** Dogs with patent *Dirofilaria immitis* infection have higher expression of circulating IL-4, IL-10 and iNOS mRNA than those with occult infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 115(1–2):

184–8.

18 Mylonakis M.E., Harrus S. & Breitschwerdt E.B. 2019. An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Veterinary Journal*. 246: 45–53.

19 Mylonakis M.E., Koutinas A.F., Breitschwerdt E.B., Hegarty B.C., Billinis C.D., Leontides L.S. & Kontos V.S. 2004. Chronic Canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A Retrospective Study of 19 Natural Cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 40(3): 174–184.

20 Nicolai L., Gaertner F. & Massberg S. 2019. Platelets in Host Defense: Experimental and Clinical Insights. *Trends in Immunology*. 40(10): 922–938.

21 Passeri B., Vismarra A., Cricri G., Bazzocchi C., Kramer L. & Bacci C. 2014. The adulticide effect of a combination of doxycycline and ivermectin in *Dirofilaria immitis*-experimentally infected dogs is associated with reduction in local T regulatory cell populations. *Veterinary Parasitology*. 205(1–2): 208–210.

22 Pineda C., Aguilera-Tejero E., Morales M.C., Belinchon-Lorenzo S., Gomez-Nieto L.C., Garcia P., Martinez-Moreno J.M., Rodriguez-Ortiz M.E. & Lopez I. 2017. Treatment of canine leishmaniasis with marbofloxacin in dogs with renal disease. *PLoS ONE*. 12(10): 1–17.

23 Roatt B.M., Aguiar-Soares R.D. de O., Coura-Vital W., Ker H.G., Moreira N. das D., Vitoriano-Souza J., Giunchetti R.C., Carneiro C.M. & Reis A.B. 2014. Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: Promising treatments for this neglected disease. *Frontiers in Immunology*. 5(JUN): 1–12.

24 Roatt B.M., Aguiar-Soares R.D. de O., Reis L.E.S., Cardoso J.M. de O., Mathias F.A.S., de Brito R.C.F., da Silva S.M., Gontijo N.D.F., Ferreira S. de A., Valenzuela J.G., Corrêa-Oliveira R., Giunchetti R.C. & Reis A.B. 2017. A vaccine therapy for canine visceral leishmaniasis promoted significant improvement of clinical and immune status with reduction in parasite burden. *Frontiers in Immunology*. 8(MAR).

25 Rougier S., Hasseine L., Delaunay P., Michel G. & Marty P. 2012. One-year clinical and

parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. 186(3–4): 245–53.

26 Sabaté D., Llinás J., Homedes J., Sust M. & Ferrer L. 2014. A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Preventive Veterinary Medicine*. 115(1–2): 56–63.

27 Solano-Gallego L., Miró G., Koutinas A., Cardoso L., Pennisi M.G., Ferrer L., Bourdeau P., Oliva G. & Baneth G. 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*. 4(1): 86.

28 Tavela A.D.O., Patricia A., Veiga M. & Zimmermann F.C.. 2021. Leishmaniose visceral em cães. *Acta Scientiae Veterinariae*. 49(December 2020): 1–12.

29 Todorovic S. & McKay T. 2020. Potential mosquito (Diptera: Culicidae) vectors of *Dirofilaria immitis* from residential entryways in Northeast Arkansas. *Veterinary Parasitology*. 282(October 2019): 109105.

30 Toepp A., Larson M., Wilson G., Grinnage-Pulley T., Bennett C., Leal-Lima A., Anderson B., Parrish M., Anderson M., Fowler H., Hinman J., Kontowicz E., Jefferies J., Beeman M., Buch J., Saucier J., Tyrrell P., Gharpure R., Cotter C. & Petersen C. 2018. Randomized, controlled, double-blinded field trial to assess *Leishmania* vaccine effectiveness as immunotherapy for canine leishmaniosis. *Vaccine*. 36(43): 6433–6441.

31 Toepp A.J., Monteiro G.R.G., Coutinho J.F. V., Lima A.L., Larson M., Wilson G., Grinnage-Pulley T., Bennett C., Mahachi K., Anderson B., Ozanne M. V., Anderson M., Fowler H., Parrish M., Willardson K., Saucier J., Tyrell P., Palmer Z., Buch J., Chandrashekar R., Brown G.D., Oleson J.J., Jeronimo S.M.B. & Petersen C.A. 2019. Comorbid infections induce progression of visceral leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. 12(1): 54.

32 Toepp A.J. & Petersen C.A. 2020. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. *Research in*

Veterinary Science. 130(January): 19–25.

33 Travi B.L. & Miró G. 2018. Use of domperidone in canine visceral leishmaniasis: gaps in veterinary knowledge and epidemiological implications. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 113(11): e180301.

34 Villaescusa A., García-sancho M., Rodríguez-franco F., Tesouro M.Á. & Sainz Á. 2015. Effects of doxycycline on haematology , blood chemistry and peripheral blood lymphocyte subsets of healthy dogs and dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. *The Veterinary Journal*. 204(3): 263–268.

9 CONCLUSÕES

A exposição à *Ehrlichia*, o cachorro grande, dormir do lado de fora e famílias de baixa classe social são fatores de risco para leishmaniose visceral canina. Além disso, a associação com variáveis sociais prova que o conceito de One Health é mais adequado em áreas urbanas endêmicas.

O diagnóstico de erliquiose canina não deve se basear na contagem de plaquetas sendo a combinação ideal de métodos e técnicas determinada pela endemicidade, da disponibilidade de tecnologia no local, dos sinais clínicos e laboratoriais.

O protocolo terapêutico criterioso é capaz de proporcionar uma vida clínica saudável em um cão com comorbidade leishmaniose visceral, erliquiose canina e dirofilariose.

A percepção e conhecimento do médico veterinário determinam o sucesso na prevenção, detecção e tratamento da erliquiose e leishmaniose visceral caninas.

Esta tese reforça o conceito de Saúde Única, em que a saúde humana, animal e ambiental estão intimamente relacionadas, e medidas preventivas devem incorporar este conceito.

10 PERSPECTIVAS

Considerando o pioneirismo deste trabalho em analisar os fatores de risco para leishmaniose visceral canina dentro do conceito de Saúde Única, pode-se estimular futuros trabalhos na descrição de doenças englobando fatores ambientais, humanos e animais. A partir do conhecimento e aplicação do conceito é possível prever, prevenir, controlar e tratar doenças como a leishmaniose visceral e outras zoonoses com maior eficácia.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR-SOARES, R. D. O. *et al.* Phase I and II Clinical Trial Comparing the LBSap, Leishmune®, and Leish-Tec® Vaccines against Canine Visceral Leishmaniasis. **Vaccines**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 690, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33212786/>. Acesso em: 25 ago. 2021.
- AGUIAR, D. M. *et al.* Prevalence of Ehrlichia canis (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of medical entomology**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 126–32, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17294930/>. Acesso em: 30 ago. 2021.
- AGUIAR, D. M. *et al.* Uncommon Ehrlichia canis infection associated with morulae in neutrophils from naturally infected dogs in Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, [s. l.], v. 67, n. S2, p. 135–141, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31721463/>. Acesso em: 1 set. 2021.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004349>. Acesso em: 31 ago. 2021.
- AKHOUNDI, M. *et al.* Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 57, p. 1–29, out./2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28159546/>. Acesso em: 3 set. 2021.
- ASSIS, J. *et al.* Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 17–25, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpv/a/T6RS4F4g7Ngk9NNQ4bcfHtf/?lang=pt>. Acesso em: 2 set. 2021.
- AZEVEDO, R. C. F. *et al.* Leishmaniose Visceral no Brasil : o que é preciso saber. **Brazilian Journal of Global Health**, v.1, n.3, p. 24–31, 2021. Disponível em: <https://revistas.unisa.br/index.php/saudeglobal/article/view/259>. Acesso em: 31 ago. 2021.
- BATISTA, L. F. S. *et al.* Chromosomal segments may explain the antibody response cooperation for canine leishmaniasis pathogenesis. **Veterinary Parasitology**, v. 288, p. 109276, dez. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33152678/>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- BERMUDI, P. M. M. *et al.* Canine serological survey and dog culling ant its relationship with human visceral leishmaniasis in an endemic urban area. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-020-05125-0>. Acesso em: 28 ago. 2021.

BEZERRA, J. M. T. *et al.* Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 9, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30188898/>. Acesso em: 15 ago. 2021.

BOGGIATTO, P. M. *et al.* Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21532741/>. Acesso em: 3 set. 2021.

BORIN, S.; CRIVELENT, L. ; FERREIRA, F. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 566–571, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/GgXhDRpvk7cHcpbkscQwQ6B/?lang=pt>. Acesso em: 30 ago. 2021.

BOUZA-MORA, L. *et al.* Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. **Ticks and Tick-borne Diseases**, [s. l.], v. 8, n.1, p. 36–40, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral. **Guia de Vigilância em Saúde**, Brasília: Ministério da Saúde, p. 521–542, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**, Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASILEISH. Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina. Diretrizes. **Brasileish**. 2018. Disponível em: <https://www.brasileish.com.br/diretrizes.htm>. Acesso em: 25 nov. 2019.

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Sequential Evaluation of Dogs Naturally Infected with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 36, n. 9, p. 2645–2651, 1998a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9705408/>. Acesso em: 3 set. 2021

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 362–368, 1998b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9527787/>. Acesso em: 3 set. 2021.

BREMER, W. G. *et al.* Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 131, n. 1–2, p. 95–105, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15941624/>. Acesso em: 4 set. 2021.

BUHLES, W. C.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M. Tropical Canine Pancytopenia: Clinical, Hematologic, and Serologic Response of Dogs to Ehrlichia canis Infection, Tetracycline Therapy, and Challenge Inoculation. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 130, n. 4, p. 357–367, 1974. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4140878/>. Acesso em: 24 ago. 2021.

BURNHAM, A. C. *et al.* Exploring the relationship between susceptibility to canine leishmaniosis and anti-Phlebotomus perniciosus saliva antibodies in Ibizan hounds and dogs of other breeds in Mallorca, Spain. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–15, 2020. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-3992-8>. Acesso em: 25 ago. 2021

CHAUHAN, P. *et al.* Redundant and regulatory roles for Toll-like receptors in Leishmania infection. **Clinical and Experimental Immunology**, [s. l.], v. 190, n. 2, p. 167–186, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28708252/>. Acesso em: 26 ago. 2021.

COSTA, M. P. *et al.* Bioquímica sérica de cães infectados por Ehrlichia canis, Anaplasma platys e Leishmania sp. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 1–7, 2015.

COURA-VITAL, W. *et al.* Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by Leishmania infantum: A large scale intervention study in an endemic area in Brazil. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 1–17, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30532255/>. Acesso em: 31 ago. 2021.

COURTENAY, O. *et al.* Combining epidemiology with basic biology of sand flies, parasites, and hosts to inform leishmaniasis transmission dynamics and control. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1–13, 2017.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 149, n. 3–4, p. 139–146, 2007.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 152, n. 3–4, p. 173–185, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18280045/>. Acesso em: 10 set. 2021.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Leishmania-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of Leishmania infantum and Leishmania braziliensis kinetoplast DNA in canine blood samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 31, p. 65–69, fev. 2017.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Ehrlichia spp. infection in rural dogs from remote indigenous villages in north-eastern Brazil. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 139, 2018a.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Level of agreement between two commercially available rapid serological tests and the official screening test used to detect Leishmania seropositive dogs in Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 234, n. 66, p. 102–104, abr./ 2018b.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 97–101, 2019.

DEY, R. *et al.* Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1 β . **Cell Host & Microbe**, v. 23, n. 1, p. 134–143.e6, jan. 2018.

DOS-SANTOS, W. L. C. *et al.* Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 123, n. 3–4, p. 251–9, 15 jul. 2008.

DUBIE, T. *et al.* An insight review on canine ehrlichiosis with emphasis on its epidemiology and pathogenesis importance. **Global Journal of Veterinary Medicine and Research**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 59–67, 2014.

FALEIRO, R. J. *et al.* Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. e2914, 2014.

FONSECA, J. P. *et al.* Hematological parameters and seroprevalence of ehrlichia canis and babesia vogeli in dogs. **Ciencia Animal Brasileira**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–9, 2017.

FREITAS, J. C. C. DE *et al.* Analysis of Seasonality, Tendencies and Correlations in Human and Canine Visceral Leishmaniasis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. October, p. 1151, 2013.

GRAY, J. *et al.* Systematics and ecology of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus. **Ticks and tick-borne diseases**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 171–80, 2013.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): An overview. **The Veterinary Journal**, [s. l.], v. 187, n. 3, p. 292–296, 2011.

IRWIN, P. J. It shouldn't happen to a dog . . . or a veterinarian: Clinical paradigms for canine vector-borne diseases. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 104–112, 2014.

JONGEJAN, F. *et al.* Comparative efficacy of oral administrated afoxolaner (NexGard[®]) and fluralaner (Bravecto[®]) with topically applied permethrin/imidacloprid (Advantix[®]) against transmission of Ehrlichia canis by infected Rhipicephalus sanguine. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 604–15, 2011.

KAZIMOTO, T. A. *et al.* Impact of 4% Deltamethrin-Impregnated Dog Collars on the Prevalence and Incidence of Canine Visceral Leishmaniasis. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 356–363, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29683394/>. Acesso em: 25 ago. 2021.

KRAWCZAK, F. S. *et al.* Leishmania, Babesia and Ehrlichia in urban pet dogs: Co-infection or cross-reaction in serological methods? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 64–68, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/YPNhvVNLVRB8n46zvSk8zRq/?lang=en>. Acesso em: 2 set. 2021.

LANA, R. S. *et al.* Ecoepidemiological aspects of visceral leishmaniasis in an endemic area in the Steel Valley in Brazil: An ecological approach with spatial analysis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1–20, 2018. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/33824>. Acesso em: 27 jul. 2021.

LARA-SILVA, F. O. *et al.* Evaluation of chemical spraying and environmental management efficacy in areas with minor previous application of integrated control actions for visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 176, dez./ 2016, p. 109–113, 2017.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 210–214, 2003.

LIMA, A. L. *et al.* Serum TNF-alpha and IL-10 in Ehrlichia spp. Naturally Infected Dogs. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 43, n. 1322, p. 1–7, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/284159870_Serum_TNF-a_and_IL-10_in_Ehrlichia_spp_Naturally_Infected_Dogs. Acesso em: 20 jul. 2021.

LIMA, V. M. F. *et al.* Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 3–4, p. 330–333, 2010.

LOPES, E. G. *et al.* Vaccine effectiveness and use of collar impregnated with insecticide for reducing incidence of Leishmania infection in dogs in an endemic region for visceral leishmaniasis, in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 146, n. 3, p. 401–406, 2018.

MAEDA, K. *et al.* Human infection with Ehrlichia canis, a leukocytic rickettsia. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 316, n. 14, p. 853–856, 1987.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Biomarkers Associated With Leishmania infantum Exposure, Infection, and Disease in Dogs. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. September, p. 1–18, 2018.

MAKINO, H. *et al.* Ehrlichia canis detection in dogs from Várzea Grande: a comparative analysis of blood and bone marrow samples. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 310–314, 2015.

MALLAPATY, S. The search for animals harbouring coronavirus — and why it matters. **Nature**, v. 591, n. 7848, p. 26–28, mar./ 2021.

MARSHALL-PESCINI, S. *et al.* Integrating social ecology in explanations of wolf–dog behavioral differences. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, [s. l.], v. 16, p. 80–86, 2017.

MEIRA, C. S.; GEDAMU, L. Protective or Detrimental? Understanding the Role of Host Immunity in Leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 695, 13 dez. 2019.

MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2016.

MOUMÈNE, A.; MEYER, D. F. Ehrlichia's molecular tricks to manipulate their host cells. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 172–179, 2016.

MYLONAKIS, M. E. *et al.* Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 91, n. 2–3, p. 197–204, 2003.

MYLONAKIS, M. E. *et al.* Chronic Canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A Retrospective Study of 19 Natural Cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 174–184, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15131097/>. Acesso em: 30 jul. 2021.

MYLONAKIS, M. E.; HARRUS, S.; BREITSCHWERDT, E. B. An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). **Veterinary Journal**, [s. l.], v. 246, p. 45–53, 2019.

MYLONAKIS, M. E.; THEODOROU, K. N. Canine Monocytic Ehrlichiosis: An Update on Diagnosis and Treatment. **Acta Veterinaria**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 299–317, 2017.

NAUCKE, T. J.; AMELUNG, S.; LORENTZ, S. First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–4, 2016.

NEVES, E. C. *et al.* Erliquiose Monocítica Canina : Uma zoonose em ascensão e suas limitações diagnósticas no Brasil. **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 12, n. 40, p. 1–7, 2014.

NOACK, S. *et al.* Heartworm disease – Overview, intervention, and industry perspective. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 16, p. 65–89, ago./2021.

NOGUEIRA, F. S, *et al.* Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 79, 8 dez. 2019.

- O'HAIRE, M. Companion animals and human health: Benefits, challenges, and the road ahead. **Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 226–234, 2010.
- OSTRANDER, E. A. *et al.* Demographic history, selection and functional diversity of the canine genome. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 705–720, 2017.
- OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E. B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 157–163, 2009.
- PEREIRA, M. A. *et al.* Canine neutrophils cooperate with macrophages in the early stages of *Leishmania infantum* in vitro infection. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 1–13, 2019.
- PEREZ, M. *et al.* Human Infection with *Ehrlichia Canis* Accompanied by Clinical Signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1078, n. 1, p. 110–117, 2006.
- PINEDA, C. *et al.* Treatment of canine leishmaniasis with marbofloxacin in dogs with renal disease. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1–17, 2017.
- PRICE, E. O. Behavioral aspects of animal domestication. **Quarterly Review of Biology**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 1–32, 1984.
- QUINNELL, R. J. *et al.* Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. **Immunogenetics**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 23–28, 2003.
- RAMPAZZO, R. C. P. *et al.* A ready-to-use duplex qPCR to detect *Leishmania infantum* DNA in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 246, p. 100–107, jul./2017.
- REZENDE, M. B. *et al.* Detection of *Leishmania* spp. in Bats from an Area of Brazil Endemic for Visceral Leishmaniasis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 6, p. e36–e42, 2017.
- RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. **The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection.**, 2012.
- RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**. [s.l.], v.2, mar./2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3417510/>. Acesso em: 31 ago. 2021.
- RIKIHISA, Y. Diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis: Development of advanced techniques to combat a global disease. **Veterinary Journal**, [s. l.], v. 187, n. 3, p. 285–286, 2011.
- RISTIC, M. *et al.* Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 226–231, 1972.

RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites? **Trends in parasitology**, [s. l.], v. 25, n. 11, p. 505–10, 2009.

ROATT, B. M. *et al.* Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: Promising treatments for this neglected disease. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 5, p. 1–12, 2014.

ROATT, B. M. *et al.* A Vaccine Therapy for Canine Visceral Leishmaniasis Promoted Significant Improvement of Clinical and Immune Status with Reduction in Parasite Burden. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 8, n. mar./2017.

RODRIGUES, A. C. M. *et al.* Molecular identification of Lutzomyia migonei (Diptera: Psychodidae) as a potential vector for Leishmania infantum (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 220, p. 28–32, 2016.

RODRIGUES, V. *et al.* Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. **Parasites & vectors**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 118, 2016.

RODRÍGUEZ-ALARCÓN, C. A. *et al.* Demonstrating the presence of Ehrlichia canis DNA from different tissues of dogs with suspected subclinical ehrlichiosis. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–7, 2020.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251–262, 2014.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! **International Immunology**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.

SAITO, T. B. *et al.* Canine infection by rickettsiae and ehrlichiae in southern Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, [s. l.], v. 79, n. 1, p. 102–8, 2008.

SANTOS-GOMES, G. M. *et al.* Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by Leishmania infantum. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 88, n. 1–2, p. 21–30, 6 set. 2002.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. *et al.* Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (Leishmania infantum) in symptomatic and asymptomatic dogs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 1, p. 82–86, 2005.

SCORZA, B. M. *et al.* Differential Activation of Human Keratinocytes by Leishmania Species Causing Localized or Disseminated Disease. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 10, p. 2149–2156, 1 out. 2017.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016.

SILVA, A. C. T. *et al.* Prednisolone associated with doxycycline on the hematological parameters and serum proteinogram of dogs with ehrlichiosis. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 1–9, 2021.

SILVA, F. L. *et al.* Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1–2, p. 55–59, mar. 2009.

SILVA, R. A. *et al.* Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 113, n. 5, p. 1–9, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/x4B4pRhndcx7yqyxgcRHZJ/abstract/?lang=en>. Acesso em: 25 jul. 2021.

SILVA, S. C. P. F. *et al.* Effectiveness of the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars for preventing transmission of canine leishmaniasis by *Lutzomyia* spp.: A cluster randomized controlled trial. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 171, n. September, p. 104770, nov. 2019.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 86, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Diagnostic Challenges in the Era of Canine Leishmania infantum Vaccines. **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 1–12, 2017.

STICH, R. W. *et al.* Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 158, n. 4, p. 256–273, 2008.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, [s. l.], v. 7, n. 9, 2017.

TAFURI, W. L. *et al.* An alternative immunohistochemical method for detecting Leishmania amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of immunological methods**, v. 292, n. 1–2, p. 17–23, set. 2004.

TANIKAWA, A. *et al.* Ehrlichia canis in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: Serology, molecular detection and associated factors. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 474–477, 2013.

TEIXEIRA, A. I. P. *et al.* Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A challenge for current and future tests. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 114, n. 1, p. 1–9, 2019.

THIRUMALAPURA, N. R.; WALKER, D. H. Ehrlichia. In: **Molecular Medical Microbiology**. [s.l.]: Elsevier, 2015. v. 3. p. 2011–2032.

TOEPP, A. *et al.* Randomized, controlled, double-blinded field trial to assess Leishmania vaccine effectiveness as immunotherapy for canine leishmaniosis. **Vaccine**, v. 36, n. 43, p. 6433–6441, out. 2018.

TOEPP, A. J. *et al.* Maternal Leishmania infantum infection status has significant impact on leishmaniasis in offspring. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. e0007058, 2019a.

TOEPP, A. J. *et al.* Comorbid infections induce progression of visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 54, dez./ 2019b.

TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 130, p. 19–25, 2020.

TRAVI, B. L.; MIRÓ, G. Use of domperidone in canine visceral leishmaniasis: gaps in veterinary knowledge and epidemiological implications. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 11, p. e180301, 2018.

UENO, T. E. H. *et al.* Ehrlichia canis em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 18, n. 03, p. 57–61, 2009.

VASCONCELOS, T. C. B. *et al.* Canine susceptibility to visceral leishmaniasis: A systematic review upon genetic aspects, considering breed factors and immunological concepts. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 74, , p. 103293, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28987807/>. Acesso em: 10 ago. 2021.

VIEIRA, R. F. D. C. *et al.* Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 01–12, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpv/a/ZfLTRf69df4MhktFVwqv7dy/?lang=en>. Acesso em: 8 set. 2021.

VILLAESCUSA, A. *et al.* Effects of doxycycline on haematology , blood chemistry and peripheral blood lymphocyte subsets of healthy dogs and dogs naturally infected with Ehrlichia canis. **The Veterinary Journal**, [s. l.], v. 204, n. 3, p. 263–268, 2015.

VILLANUEVA-SAZ, S. *et al.* Comparison of a qualitative immunochromatographic test with two quantitative serological assays for the detection of antibodies to Leishmania infantum in dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 61, n. 1, p. 1–6, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6686240/>. Acesso em: 15 ago. 2021.

VIOL, M. A. *et al.* Identification of Leishmania spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of Rhipicephalus sanguineus actively infesting dogs. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 115, n. 9, p. 3479–3484, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27169724/>. Acesso em: 27 jul. 2021.

WANER, T. *et al.* Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary parasitology**, [s. l.], v. 69, n. 3–4, p. 307–17, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9195740/>. Acesso em: 3 set. 2021.

WAYNE, R. K.; OSTRANDER, E. A. Lessons learned from the dog genome. **Trends in Genetics**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 557–567, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17963975/>. Acesso em: 2 set. 2021.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 851–856, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/PZkg8XHnTxMydBNHHNY5zfv/?lang=en>. Acesso em: 25 ago. 2021.

WILLI, L. M. V. *et al.* Serological evidence of canine exposure to arthropod-borne pathogens in different landscapes in Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 7, p. 40–44, jan. 2017. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/20130>. Acesso em: 1 ago. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. **Weekly epidemiological record**, v. 92, n. 38, p. 557–565, 2017.

YIMAM, Y.; MOHEBALI, M. Effectiveness of insecticide-impregnated dog collars in reducing incidence rate of canine visceral leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 9 September 2020, p. 1–15, 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0238601>. Acesso em: 30 jul. 2021.

ZELLER, U.; GÖTTERT, T. The relations between evolution and domestication reconsidered - Implications for systematics, ecology, and nature conservation. **Global Ecology and Conservation**, v. 20, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2351989419303853>. Acesso em: 24 jul. 2021.

ZINSSTAG, J. *et al.* From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 101, n. 3–4, p. 148–156, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20832879/>. Acesso em: 25 jul. 2021.

ZUBEN, A. P. B.; DONALÍSIO, M. R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, , 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/PLxTwghysWd8JyCYrrnmnTM/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 6 set. 2021.

**APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO SOCIODEMOGRÁFICO E EPIDEMIOLÓGICO
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA 2018/19**



**Universidade Estadual do Ceará
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias**



Questionário sociodemográfico e epidemiológico Leishmaniose Visceral Canina 2018/19

DATA _____ QUADRA _____ CODIGO CÃO UVZ _____

1. Identificação ambiente/proprietário:

1.1. Tempo que mora no local?	Mais de 3 anos	Menos de 3 anos
-------------------------------	----------------	-----------------

1.2. Endereço: _____

1.3. Tutor: _____

1.4. Telefone: _____

1.5 Email: _____

1.6. Algum morador já teve Calazar?	Sim	Não
1.7. Algum Animal já teve Calazar?	Sim	Não

1.8. Quantas pessoas residem na casa?	0	1	2	3	4 ou mais
1.9. Quantidade de cômodos para dormir?	0	1	2	3	4 ou mais
1.10. Quantidade de Banheiro?	0	1	2	3	4 ou mais
1.11. Automóvel?	0	1	2	3	4 ou mais
1.12. Motocicleta?	0	1	2	3	4 ou mais
1.13. Computador?	0	1	2	3	4 ou mais
1.14. DVD?	0	1	2	3	4 ou mais
1.15. Lava Louças?	0	1	2	3	4 ou mais
1.16. Geladeira?	0	1	2	3	4 ou mais
1.17. Freezer?	0	1	2	3	4 ou mais
1.18. Micro-ondas?	0	1	2	3	4 ou mais
1.19. Lava Roupas?	0	1	2	3	4 ou mais

1.20. Água encanada	Sim	Não
1.21. Rua pavimentada	Sim	Não

1.22 Escolaridade da pessoa de referência?	
Analfabeto / Fundamental I incompleto	
Fundamental I completo / Fundamental II incompleto	
Fundamental II completo / Médio incompleto	
Médio completo / Superior incompleto	
Superior completo	

1.23. Possui conta em banco?	Sim	Não
------------------------------	-----	-----

2. Identificação do cão: NOME:**NÚMERO:**

2.1. Sexo	Macho		Fêmea
2.2. Idade	0-1	2-6	> 7
2.3. Castrado	Sim		Não
2.4. Pelagem	Longo	Médio	Curto
2.5. Cor	Claro	Médio	Escuro
2.6. Tamanho	Pequeno	Médio	Grande

2.7. Vacina Anti rábica	Sim	Não		
2.8. Vacinas Virais	Sim	Não		
2.9. Vacina Leishamiose	Sim	Não		
2.10. Vermifugado?	Não	trimestral	Semestral	Anual

2.11. Carrapatos	Não	1-3	4-10	> 10
2.12. Prevenção carrapatos	Sim		Não	
2.13. Pulgas	Não	1-5	6-20	> 20
2.14. Uso de coleiras repelente?	Sim		Não	
2.15. Banhos	Não	1x /semana	1x /mês	Esporadicamente
2.16. Banho domiciliar	Sim		Não	
2.17. Banho inseticidas	Sim		Não	

2.18. Lugar onde dorme?	Cozinha	Sala	Quarto	Quintal
2.19. Quintal com matéria orgânica?	Sim		Não	
2.20. Piso do quintal?	Não	Piso	Areia / mato	
2.21. Galinhas?	Sim		Não	
2.22. Outras aves?	Sim		Não	
2.23. Suínos?	Sim		Não	
2.24. Gambás ou tatus?	Sim		Não	
2.25. Árvore Frutífera?	Sim		Não	
2.26. Fezes acumuladas?	Sim		Não	
2.27. Despejo das fezes no lixo?	Lixo	Sanitário		Rua
2.28. Mais de um cachorro?	Sim		Não	
2.29. Cria gatos?	Sim		Não	
2.30. Uso de inseticidas no ambiente?	Sim		Não	

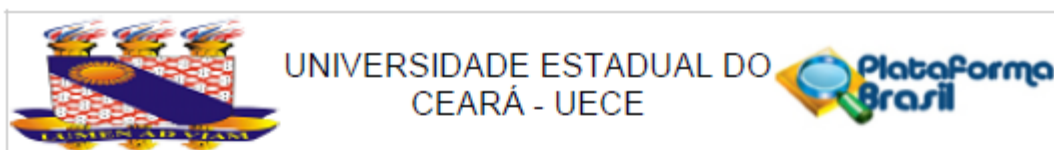
2.31 Acesso à rua?	Supervisionado	Solto	Não
2.32. Come ração?	Sim		Não
2.33. Come comida caseira?	Sim		Não
2.34. Está tomando algum remédio?	Sim		Não
2.35. Já levou ao veterinário?	Sim		Não

O que faz quando animal adoece?

3. Critérios de Inclusão / Exclusão:

3.1. Resultado DPP Leishmaniose?	Sim	Não
----------------------------------	-----	-----

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Doenças transmitidas por carrapatos e sua importância no risco de leishmaniose visceral canina: erliquiose

Pesquisador: ADAM LEAL LIMA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 40693720.5.0000.5534

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ FUNECE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.692.245

Apresentação do Projeto:

Estudo a ser realizado através da aplicação de questionários em famílias que são tutoras de cães, residentes nas regionais I e IV do município de Fortaleza-CE, para avaliar fatores de riscos e incidências da erliquiose canina e leishmaniose visceral canina. Também serão realizadas coletas de sangue nos animais para confirmação das infecções (aprovado previamente pelo CEUA da UECE).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Determinar risco relativo de cães expostos à Ehrlichia canis em adquirir Leishmania infantum.

Objetivo Secundário:

Determinar as características dos cães e das famílias da coorte. Determinar os fatores de risco relacionados à incidência e prevalência de leishmaniose visceral canina. Determinar os fatores de risco relacionados à incidência e prevalência de erliquiose canina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: desconforto emocional, dificuldade ou desinteresse. Tudo foi planejado para minimizar os riscos da participação.

Benefícios:

Endereço: Av. Silas Munguba, 1700

Bairro: Itaperi

CEP: 60.714-903

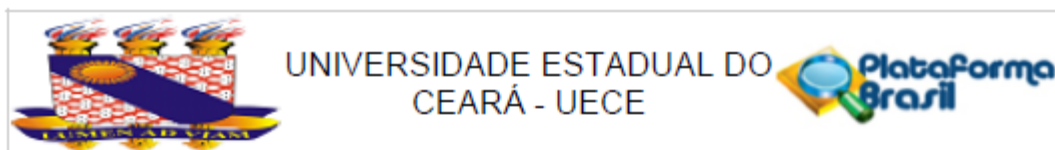
UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3101-9890

Fax: (85)3101-9906

E-mail: cep@uece.br



Continuação do Parecer: 4.692.245

Estudo descritivo de fatores de risco e epidemiológicos podem ser usados para determinar ações de prevenção de doenças, incluindo a saúde do cão e das famílias. No caso, a leishmaniose visceral permanece sendo uma doença de alta letalidade no Brasil e o cão um dos seus reservatórios urbanos, a diminuição de casos caninos deverá prover diminuição de casos humanos, englobando o conceito de saúde única.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é importante por buscar fatores associados a incidências de erliquiose e leishmaniose canina em regiões de alta prevalência de tais enfermidades no município de Fortaleza-CE. Os resultados do estudo podem ser bastante significativos e aplicados por gerar dados que possam orientar a população e aos órgãos competentes medidas para diminuição da transmissão.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória estão de acordo com a resolução 466 da CONEP.

Recomendações:

Enviar relatório ao final da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

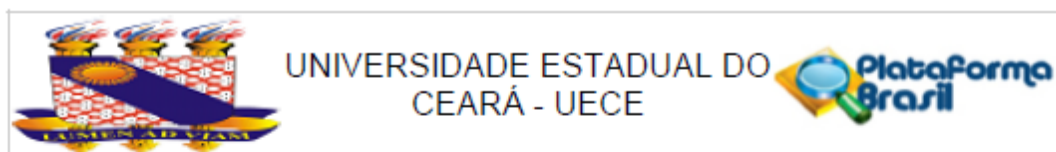
Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1670127.pdf	16/03/2021 12:34:29		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeConsentimento21.doc	23/02/2021 11:51:44	ADAM LEAL LIMA	Aceito
Orçamento	planilhaorcamentariaCEP21.docx	19/01/2021 10:46:41	ADAM LEAL LIMA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CEPProjetoAdamLealLima24112020.pdf	24/11/2020 14:15:36	ADAM LEAL LIMA	Aceito
Declaração de concordância	cartaanuenciaccz2020.pdf	24/11/2020 14:14:21	ADAM LEAL LIMA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termoresponsabilidadeassinado.pdf	24/11/2020 14:13:41	ADAM LEAL LIMA	Aceito

Endereço: Av. Silas Munguba, 1700
 Bairro: Itaperi CEP: 60.714-903
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3101-9890 Fax: (85)3101-9906 E-mail: cep@uece.br



Continuação do Parecer: 4.692.245

Parecer Anterior	CEUAECOLEISH.pdf	24/11/2020 14:11:19	ADAM LEAL LIMA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoCEPconvertido.pdf	24/11/2020 14:07:04	ADAM LEAL LIMA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 05 de Maio de 2021

Assinado por:
Rhanna Emanuela Fontenele Lima de Carvalho
(Coordenador(a))

ANEXO B – CERTIFICADO DO PROJETO DE PESQUISA

 UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ	Comissão de Ética para o Uso de Animais Av. Silas Munguba, 1700 - Itaperi CEP 60740-903 - fone 3101-9890 ceua.uece@uece.br - www.uece.br/ceua	 GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ Instituto de Ciência, Tecnologia e Educação Superior
---	--	--

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Doenças transmitidas por carrapatos e sua importância na imunomodulação da leishmaniose visceral canina: erliquiose" registrado sob o 9057278/2017, tendo como pesquisador principal Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA – UECE). Este certificado expira-se em 31 de dezembro 2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Project entitled "Doenças transmitidas por carrapatos e sua importância na imunomodulação da leishmaniose visceral canina: erliquiose" registered with the protocol 9057278/2017 under the supervision of Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA – UECE). This certificate will expire on December 31st, 2020.

RESUMO

Vigência do projeto	Março de 2018 a julho de 2020
Espécie/linhagem	Cão doméstico (<i>Canis lupus familiaris</i>)
Número de animais	800
Peso/idade	5 a 40 kg/1 a 8 anos
Sexo	Machos (300) e fêmeas (300)
Origem	Domicílios em bairros definidos como zonas de alta transmissão de LVC

Fortaleza, 5 de dezembro de 2018.

Erivalda Farias de Aragão

Maria Erivalda Farias de Aragão
Presidente CEUA-UECE