

Utilização da imunoterapia no tratamento da leishmaniose visceral canina

Use of Immunotherapy in the Treatment of Canine Visceral Leishmaniasis

Adjanna Karla Leite Araujo¹ & Adriana Leão de Carvalho Lima Gondim²

ABSTRACT

Background: Canine visceral leishmaniasis is a worldwide zoonosis, with dogs being the main urban reservoirs. It is caused by a protozoan of the genus *Leishmania* spp. and is transmitted to mammals through a vector belonging to the phlebotomines family. Its treatment aims to reduce the parasitic load preventing these animals from being transmitters. Immunotherapy has been shown to be efficient in stimulating the patient's immune response, improving the general condition and preventing recurrence. This report describes the case of a dog diagnosed with canine visceral leishmaniasis submitted to immunotherapy and drug protocol, noting significant general improvement.

Case: An 8-year-old female dog was treated with ulcerated lesions on the paw pads, nasal plane and lip region, onychogryphosis and ungueitis, in addition, hypertrophied popliteal lymph nodes and erosive lesions in the elbows, without improvement with previous treatments. Serological examination was then performed to diagnose leishmaniasis by the immunosorbent assay (ELISA) technique with negative results. In addition, was performed puncture of the popliteal lymph node, sample in which amastigote forms of *Leishmania* were observed and blood sample analysis by immunochromatographic rapid test showing reagent result, confirming the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. The treatment protocol with marbofloxacin, allopurinol, prednisolone and domperidone was initiated. Thirty days later, there was a total improvement of the lesions and healing of the paw pads. Immunotherapy was then initiated by applying three double doses of recombinant vaccine against canine visceral leishmaniasis. The applications were made subcutaneously, with an interval of 21 days between them, still maintaining allopurinol. After six months a fourth double dose of the vaccine was applied and ten days later a new serological examination was performed using the Indirect Immunofluorescence Reaction (IIFR) technique with total dilution, with the result not reagent. Four months later, the patient was reevaluated and a new serological test was performed through the IIFR technique with total dilution and the result was reagent with high titration (1: 320). Then began the use of milteforan and domperidone. After two months, the patient received a new vaccination booster and the use of domperidone was discontinued. After ten days a new serological examination was performed using the IIRF technique with total dilution, with reagent result, but with minimal titration (1:40).

Discussion: Canine visceral leishmaniasis is a systemic zoonosis of major public health importance. The dog, due to its proximity to humans, is considered the main reservoir of the disease. Although clinical signs are nonspecific, skin lesions such as nasal hyperkeratosis, ulcers and hyperpigmentation, as well as clinical manifestations such as lymphadenopathy, fever, epistaxis and ophthalmic changes are frequently observed. In this case, the patient presented most of the lesions described in the literature. Laboratory abnormalities in blood count and serum biochemistry, commonly observed, were not observed in the animal. The ELISA serological test, despite being used as a screening test, due to its ability to detect low antibody titers, was negative in this case. The diagnosis was confirmed by lymph node cytology, described in the literature as a confirmatory test despite being considered invasive by most authors and positive result in rapid immunochromatography test. With the protocol used, the animal showed improvement, being observed negative results or with low titration of anti-leishmania antibodies in a serological test performed using the IFAT technique, indicating a decrease in parasitic load.

Keywords: canine visceral leishmaniasis, dog, immunotherapy.

Descritores: leishmaniose visceral canina, cão, imunoterapia.

DOI: 10.22456/1679-9216.105438

Received: 6 March 2020

Accepted: 25 August 2020

Published: 26 September 2020

¹M.V. Autônoma, Caruaru, PE, Brazil. ²M.V. Autônoma, Recife, PE. CORRESPONDENCE: A.K.L. Araujo [adjanna_leite@hotmail.com] & A.L.C.L. Gondim [adrianaclg@gmail.com]. Clínica Pelo & Pele Dermatologia Veterinária. Rua Luís de Camões n. 326. CEP 55012-650 Caruaru, PE, Brazil.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma zoonose de caráter crônico e fatal, sendo considerada um grave problema de saúde pública mundial [18,24,30]. É causada por protozoários do gênero *Leishmania* sp. e a transmissão ocorre pela picada de flebotomíneos. Mamíferos podem ser acometidos, sendo o cão o principal reservatório [1,17,23-25,27,30]. O animal infectado pode ser clinicamente saudável, mas é capaz de infectar o vetor e continuar com a disseminação [13]. Os sinais clínicos incluem lesões cutâneas como alopecia, hiperqueratose nasal e úlceras, além de anorexia, onicogribose e alterações oftálmicas [14,15,19,22,24,29,31]. Pode-se ainda observar febre, linfadenopatia, epistaxe e alterações oftálmicas e alterações laboratoriais como aumento das enzimas hepáticas e renais e diminuição de albumina sérica, além de anemia normocítica normocrômica [11,20,21,31].

O diagnóstico baseia-se nos aspectos clínicos [9], e na visualização de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em esfregaços de aspirado de baço, medula óssea e linfonodo [4,13,31]. O diagnóstico laboratorial deve utilizar uma combinação de testes [2,8,12,24]. Os testes sorológicos, como o ELISA e RIFI são os recomendados [5,13,16,31]. Utiliza-se ainda testes rápidos para análise da presença de anticorpos anti-*Leishmania infantum*, através de imunocromatografia rápida [3,26].

O objetivo do tratamento é a reposição da resposta imunitária, melhora clínica do paciente e redução da carga parasitária, retirando-o assim da cadeia epidemiológica de transmissão [6,7,10,28,29].

Este trabalho tem como objetivo relatar um caso de leishmaniose visceral canina, no qual se utilizou imunoterapia e protocolo medicamentoso, observando-se melhora geral do paciente.

CASO

Um paciente da espécie canina, fêmea, com 8 anos de idade, da raça Golden Retriever foi atendida no serviço de dermatologia da Clínica Pelo e Pele - Dermatologia e Alergologia Veterinária®, localizada na cidade de Caruaru, estado de Pernambuco, com histórico de lesões cutâneas que não apresentavam melhora com os tratamentos anteriormente prescritos. No exame clínico foi possível observar a presença de lesões ulceradas em plano nasal (Figura 1) e na região labial (Figura 2), coxins plantares e palmares ulcerados (Figura 3), lesões erosivas em ambos os cotovelos, onicogribose e

ungeíte, além de linfonodos poplíteos hipertrofiados. O proprietário ainda relatava prurido intenso. Devido ao histórico clínico e as características das lesões cutâneas apresentadas pelo paciente, optou-se por realizar exame sorológico para diagnóstico de leishmaniose através da técnica de Ensaio Imunoenzimático - ELISA (EIE® Leishmaniose Visceral Canina)¹ sendo observado posteriormente resultado não reagente para a amostra analisada. Na ocasião, foram ainda realizados punção aspirativa por agulha fina do linfonodo poplíteo do paciente que se apresentava hipertrofiado, amostra na qual foi possível observar formas amastigotas de *Leishmania* (Figura 4) e análise de amostra sanguínea realizada através de imunoensaio cromatográfico (teste rápido Alere® leishmaniose AC test kit)² para detecção qualitativa de anticorpos (igG) contra *Leishmania infantum*, apresentando resultado positivo, confirmando assim o diagnóstico de leishmaniose visceral canina. Foi iniciado então o protocolo de tratamento, sendo prescritos, marbofloxacina (Marbopet®)³ na dose de 2,75 mg/kg, uma vez ao dia; alopurinol (medicamento genérico)⁴, na dosagem de 10 mg/kg a cada 12 h; prednisolona (Prediderm®)⁵ na dose 0,5 mg/kg, uma vez ao dia e domperidona (medicamento genérico)⁴ na dosagem de 0,7 mg/kg, uma vez ao dia. Após o período aproximado de 30 dias, o paciente retornou para avaliação clínica, sendo possível observar melhora significativa da lesão ulcerada que o mesmo apresentava anteriormente em plano nasal (Figura 5), na região labial (Figura 6) e cicatrização dos coxins palmares (Figura 7). Nesta data, foram realizados urinálise, hemograma e avaliação da função renal e hepática do paciente através de dosagem bioquímica sérica para acompanhamento do quadro geral do paciente, não sendo observadas alterações nos exames. Foi iniciado então o protocolo de imunoterapia, sendo aplicadas 3 doses duplas da vacina recombinante contra leishmaniose visceral canina (LeishTec®)³, por via subcutânea, com intervalo de 21 dias entre as aplicações, sendo ainda, na ocasião da aplicação da primeira dose da vacina, ajustado o protocolo de tratamento, do qual foi retirado a administração da marbofloxacina (Marbopet®)³ e a domperidona (medicamento genérico)⁴, sendo mantido o alopurinol (medicamento genérico)⁴ na dose prescrita anteriormente e iniciado o desmame da prednisolona (Prediderm®)⁵. Durante todo o período de realização da imunoterapia o paciente apresentou-se clinicamente estável e não houve recidiva das lesões cutâneas. Após

6 meses da realização do protocolo vacinal inicial foi aplicada uma quarta dose dupla da vacina e 10 dias após essa aplicação foram realizados novos exames de acompanhamento, que não apresentaram nenhuma alteração, além de novo exame sorológico através da técnica de RIFI com diluição total (IFI® Leishmaniose Visceral Canina)¹, sendo o resultado do mesmo não reagente. Após 4 meses, o paciente foi reavaliado clinicamente, sendo observado, na ocasião, lesão nodular única na cavidade oral. Foi então realizado novo teste sorológico através da técnica de RIFI com diluição total¹, sendo o resultado do mesmo reagente com titulação considerada alta (1:320), sendo, nesse teste, considerados reagentes aquelas amostras que apresentem titulação igual ao superior a 1:40. Iniciou-se então a administração de miltefosina (Milteforan®)⁶ na dose de 2 mg/kg uma vez ao dia durante 28 dias e domperidona (medicamento genérico)⁴ na dose de 0,7 mg/kg, uma vez ao dia. Dois meses após o início do protocolo medicamentoso, o paciente apresentava-se clinicamente estável e recebeu novo reforço vacinal, sendo descontinuada, nesta data, a administração da domperidona (medicamento genérico)⁴. Dez dias após a aplicação da vacina foi realizado novo exame sorológico através da técnica RIFI com diluição total¹, sendo observado resultado reagente, porém com titulação mínima (1:40).

DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral canina é uma doença sistêmica, de caráter zoonótico, que possui extrema importância para a saúde pública, sendo o cão o principal reservatório da doença [1,3,4,8,13,14,18,24,25,30], devido a sua proximidade com o homem no ambiente doméstico [19]. Os sinais clínicos nos cães são inespecíficos, porém os mais frequentemente observados são lesões cutâneas como alopecia, hiperqueratose nasal, úlceras e hiperpigmentação, além de outras manifestações clínicas como prurido, onicogribose, anorexia, linfadenopatias, febre, epistaxe e alterações oftálmicas tais como ceratoconjuntivite, uveíte anterior e blefarite [14,15,19,21,24,31]. No paciente acompanhado no presente relato, foi possível observar grande parte das lesões descritas na literatura, já que o mesmo apresentava lesões ulceradas em plano nasal, coxins plantares e palmares, lesões erosivas nos cotovelos, além de onicogribose, ungueíte e linfonodos poplíteos hipertrofiados.

Os animais acometidos podem apresentar, além dos sinais clínicos clássicos, alterações laboratoriais hematológicas e bioquímicas, sendo as mais comumente observadas o aumento sérico das enzimas hepáticas e renais, podendo apresentar ainda anemia normocítica normocrômica, além de outras alterações hematológicas e bioquímicas, além de outras alterações [8,20,24,31], porém o paciente do presente relato não apresentou alterações laboratoriais hematológicas e bioquímicas relevantes durante todo o acompanhamento do caso.

No Brasil, atualmente, os testes sorológicos, como o imunoensaio (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), são os recomendados pelo Ministério da Saúde [6,8,15,25]. O ELISA, indicado como triagem, trata-se de um teste que permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos assintomáticos [8,13,31]. Foi realizado o ELISA como teste de triagem para o paciente em questão, porém o resultado deste teste foi negativo, mesmo o animal sendo sintomático.

Na prática clínica veterinária, são comumente utilizados testes rápidos que através do método de imunocromatografia rápida, analisam qualitativamente a presença de anticorpos anti *Leishmania infantum*, sendo fáceis de executar, apresentando resultados qualitativos no momento da execução do teste [3,26]. Foi colhida amostra sanguínea do paciente e analisou-se a mesma pela técnica descrita acima, obtendo resultado positivo. O diagnóstico da leishmaniose visceral canina está fundamentado nos aspectos clínicos e na visualização de formas amastigotas de *Leishmania sp* em esfregaços de aspirado de baço, medula óssea e linfonodo, apesar de ser considerada uma técnica invasiva [4,9,13]. No presente relato, a visualização de formas amastigotas do parasita no esfregaço realizado através da punção aspirativa por agulha fina do linfonodo poplíteo do paciente foi de suma importância para a confirmação do diagnóstico.

No Brasil utiliza-se o protocolo proposto pelo Grupo de Estudos sobre Leishmaniose Animal (Brasileish) que recomenda a associação de medicações e imunoterapia com o objetivo de diminuir a carga parasitária do animal infectado, induzindo uma melhora clínica e laboratorial do paciente, tornando-o não infectante à picada do flebotômio [7]. O protocolo realizado no paciente deste relato foi o recomendado pelo Brasileish e de fato foi possível observar melhora



Figura 1. Lesão ulcerada observada em plano nasal do paciente na primeira avaliação clínica.



Figura 2. Lesão ulcerada observada na região labial do paciente na primeira avaliação clínica.



Figura 3. Paciente apresentando lesão ulcerada em coxim palmar na primeira avaliação clínica.

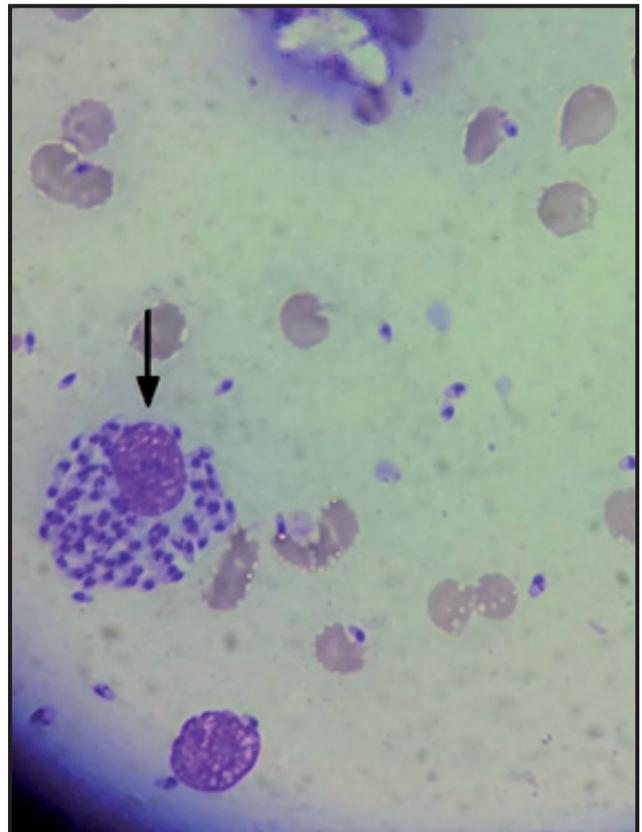


Figura 4. Macrófago contendo formas amastigotas de *Leishmania* spp. em amostra obtida em punção aspirativa por agulha fina do linfonodo poplíteo hipertrofiado do paciente [Romanowsky; Obj.100x].

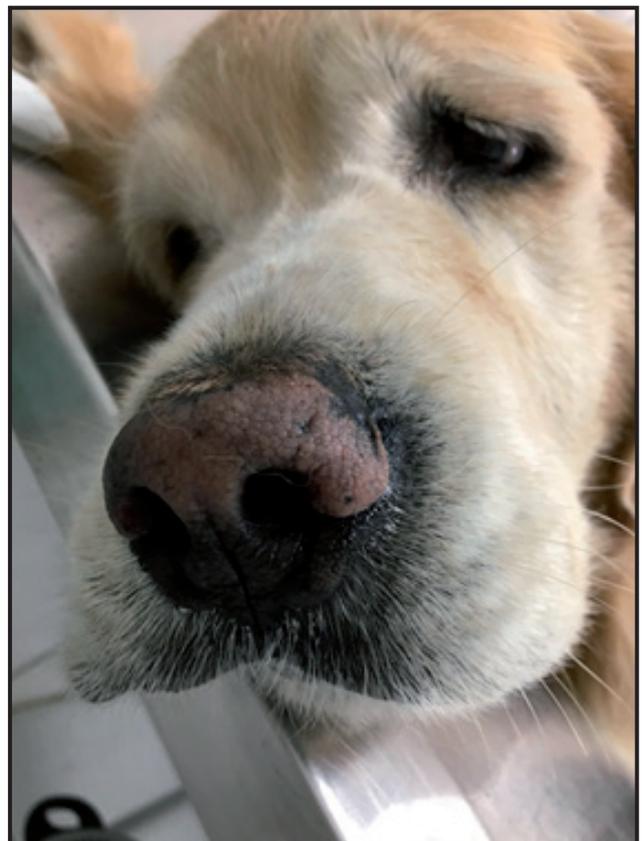


Figura 5. Paciente apresentando melhora significativa da lesão ulcerada em plano nasal, 30 dias após o início do protocolo de tratamento.

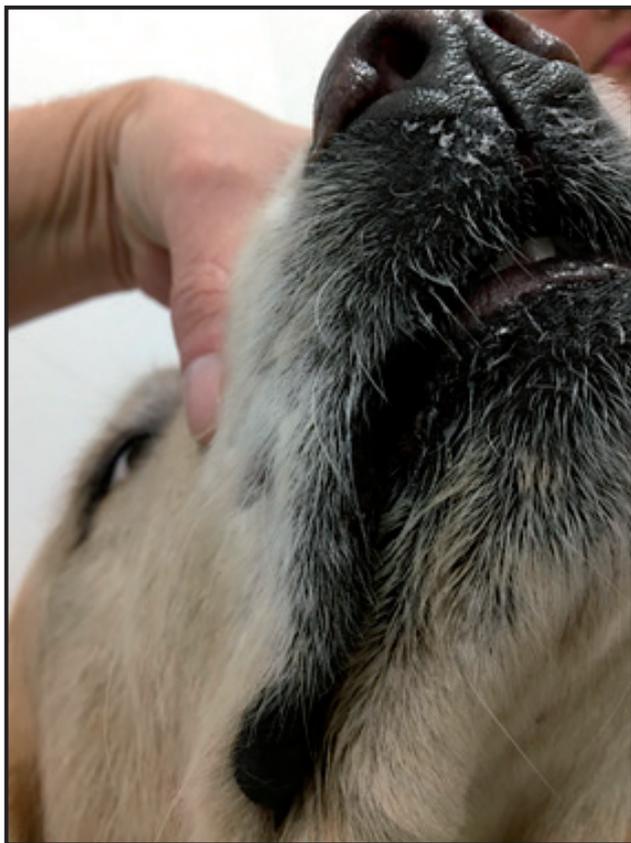


Figura 6. Paciente apresentando melhora significativa da lesão ulcerada na região labial, 30 dias após o início do protocolo de tratamento.



Figura 7. Paciente apresentando cicatrização do coxim palmar 30 dias após o início do protocolo de tratamento.

clínica do animal, já que houve evidente melhora nas lesões cutâneas que o mesmo apresentava. Além disso, após a aplicação do primeiro reforço semestral da vacina foi realizado teste sorológico através da técnica da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), obtendo como resultado negativo, o que indica que realmente ocorreu a diminuição da carga parasitária do paciente. Quatro meses depois, novo teste sorológico através da mesma técnica foi realizado, sendo o resultado do mesmo reagente com titulação considerada alta (1:320), porém não houve recidiva do quadro clínico do paciente, que apresentava uma única lesão nodular na cavidade oral. Iniciou-se então o protocolo proposto pelo Brasileish em casos de vir o paciente apresentar novamente titulações altas, sendo também realizado o reforço vacinal previsto [7]. Após o reforço vacinal, foi realizado novo exame sorológico através da técnica RIFI com diluição total, sendo observado resultado reagente, porém com titulação mínima, o que indica que o protocolo proposto pelo Brasileish é eficaz para o estadiamento da doença.

A leishmaniose é uma grave zoonose de caráter mundial. Por apresentar sinais inespecíficos, a confirmação de seu diagnóstico depende sempre da realização de exames laboratoriais. O tratamento tem o objetivo de diminuir a carga parasitária do animal infectado, interrompendo, dessa forma, o ciclo de transmissão da doença. O médico veterinário deve conscientizar a população sobre as medidas preventivas da doença, alertando sobre a utilização de repelentes adequados e a vacinação preventiva dos animais.

MANUFACTURERS

¹Fundação Oswaldo Cruz - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

²Alere S/A. Belo Horizonte, MG, Brazil.

³Ceva Saúde Animal Ltda. Paulínia, SP, Brazil.

⁴Medley Farmacêutica Ltda. Chácara Santo Antônio, SP, Brazil.

⁵Ourofino Saúde Animal. Cravinhos, SP, Brazil.

⁶Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

Declaration of interest. The authors report no conflict of interest. The authors alone were responsible for the content and writing of paper.

REFERENCES

- 1 **Abrantes P. & Silveira H. 2009.** Alterações climáticas na Europa: efeito nas doenças parasitárias humanas. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*. 27(2): 71-86.
- 2 **Alvar J., Cañavate C., Molina R., Moreno J. & Nieto J. 2004.** Canine leishmaniasis. *The Journal of Advances in Parasitology*. 57(1): 88.
- 3 **Araujo A.V.N. 2017.** Frequência de Leishmaniose visceral em cães atendidos no Hospital Veterinário da UFPB. 26f. Areia, PB. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba.
- 4 **Bevilaquia P.D. & Alves W.A. 2004.** Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Caderno de Saúde Pública*. 20(1): 259-265.
- 5 **Brasil. Ministério da Saúde. 2006.** *Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: normas e manuais técnicos*. Brasília: Ministério da Saúde. 160f.
- 6 **Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2018.** Portaria interministerial no 1.426 de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. [Fonte: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html>].
- 7 **Brasileish. 2017.** Estadiamento e Tratamento da LVC. [Fonte: <http://www.brasileish.com.br/assets/files/brasileish18_12_2017.pdf>].
- 8 **Chagas R.L.A. 2017.** Leishmaniose Visceral Canina: Perfil epidemiológico do Distrito Federal 2013-2017. 62f. Brasília-DF Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.
- 9 **Feitosa M.M., Ikeda F.A., Luvizotto M.C.R. & Perri S. 2000.** Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). *Revista Clínica Veterinária*. 5(28): 36-44.
- 10 **Fernandes C.B., Magalhães Junior J.T., Jesus C., Souza B.M., Lorangeira D.F., Fraga D.B., Tavares P.S.V., Barrouin-Melo S.M. 2014.** Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. *Vaccine*. 32(11): 1287-1295.
- 11 **Ferrer L., Rabanal R.M., Domingo M., Ramos J.A. & Fondevilla D. 1988.** Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Research in Veterinary Science*. 44(2): 194-196.
- 12 **Gomes A.H.S., Ferreira I.M., Lima M.L., Cunha E.A., Garcia A.S., Araújo M.F. & Pereira-Chiocola V.L. 2007.** Identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 144(3-4): 234-241.
- 13 **Gontijo C.M.F. & Melo M.N. 2004.** Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 7(3): 338-349.
- 14 **Greene C.E. 2011.** *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th edn. St. Louis: Saunders Elsevier, 1387p.
- 15 **Koutinas A.F. & Koutinas C.K. 2014.** Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Veterinary Pathology*. 51(2): 527-538.
- 16 **Lindsay D.S. & Zajac A.M. 2002.** Leishmaniasis in American Foxhounds: An Emerging Zoonosis. *Revista Compendium*. 24(4): 304-312.
- 17 **Miró G., Oliva G., Cruz I., Cañavate C., Mortarino M., Vischer C. & Bianciardi P. 2009.** Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniasis. *Veterinary Dermatology*. 20: 397-404.
- 18 **Pirajá G.V. & Lucheis S.B. 2014.** A vigilância epidemiológica de flebotomíneos no planejamento de ações de controle nas leishmanioses. *Veterinária e Zootecnia*. 21: 503-515.
- 19 **Reis A.B., Martins-Filho O.A., Teixeira-Carvalho A., Carneiro C.M., Tafuri W.L. & Corrêa-Oliveira R. 2009.** Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 128: 87-95.
- 20 **Reis A.B., Martins-Filho O.A., Teixeira-Carvalho A., Carvalho M.G., Mayrink W., França-Silva J.C., Giunchetti R.C., Genaro O. & Corrêa-Oliveira R. 2006.** Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*. 81: 68-75.

- 21 Ribeiro V.M., Silva S.M., Menz I., Tabanez P., Nogueira F.S., Werkhäuser M., Fonseca A.L.S. & Dantas-Torres F. 2013. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. *Parasites and Vectors*. 6: 8.
- 22 Silva D.M. 2015. Leishmaniose Visceral Canina: Análise do valor preditivo positivo da combinação dos testes diagnósticos DPP e Elisa em cães submetidos à eutanásia no Centro de controle de Zoonoses do Distrito Federal. 51f. Brasília, DF. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.
- 23 Silva F.S. 2007. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Tropical - Ciências Agrárias e Biológicas*. 1(1): 20-31.
- 24 Silva J.D., Melo D.H.M., Costa J.A.G., Costa D.F., Silva R.B.S., Melo M.A., Azevedo S.S. & Alves C.J. 2017. Leishmaniose visceral em cães de assentamentos rurais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 37(11): 1292-1298.
- 25 Silva R., Mendes R., Santana V., Souza H., Ramos C., Souza A. & Andrade P. 2016. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. (36): 625-629.
- 26 Solano-Gallego L., Koutinas A., Miró G., Cardoso L., Pennisi M.G., Ferrer L., Bourdeau P., Oliva G. & Baneth G. 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 165(1-2): 1-18.
- 27 Solano-Gallego L., Miró G., Koutinas A., Cardoso L., Pennisi M.G., Ferrer L. & Baneth G. 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. 4(86): 1-16.
- 28 Teles N.M.M., Agostini M.A.P., Bigeli J.G., Noletto R.V., Oliveira J.D. & Oliveira Junior W.P. 2012. Molecular and parasitological detection of *Leishmania* spp. in dogs caught in Palmas, TO, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 21(3): 278-282.
- 29 Vieira R.J.F. 2014. Leishmaniose Canina. 106f. Évora, Portugal. Monografia (Mestrado em Medicina Veterinária) - Mestrado integrado em Medicina Veterinária, Universidade de Évora.
- 30 Werneck G.L., Costa C.H.N., Walker A.M., David J.R., Wand M. & Maguire J.H. 2002. The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis. *Epidemiology*. 13(3): 364-367.
- 31 Zajac A.M. & Lindsay D.S. 2002. Leishmaniasis in American Foxhounds: An Emerging Zoonosis? *Revista Compendium. Blacksburg*. 21(4): 304.