

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO  
CHAGAS  
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS  
INFECCIOSAS

VIVIANE CARDOSO BOECHAT

**OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Brucella canis* EM  
CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania  
infantum* E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS ASSOCIADAS  
NO TRATO GENITAL**

Rio de Janeiro

2019

VIVIANE CARDOSO BOECHAT

**OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Brucella canis* EM  
CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania  
infantum* E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS ASSOCIADAS  
NO TRATO GENITAL**

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Rodrigo Caldas Menezes

Rio de Janeiro

2019

VIVIANE CARDOSO BOECHAT

**OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Brucella canis* EM  
CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania  
infantum* E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS ASSOCIADAS  
NO TRATO GENITAL**

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Rodrigo Caldas Menezes

Orientador: Dr. Rodrigo Caldas Menezes

Aprovada em 18/06/2019

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Fernanda Nazaré Morgado (Presidente)

Doutora em Ciências

Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose/FIOCRUZ

---

Dra. Luisa Helena Monteiro de Miranda

Doutora em Ciências

Serviço de Anatomia Patológica/FIOCRUZ

---

Prof. Dra. Patricia Riddell Millar Goulart

Doutora em Higiene Veterinária e Processamento em Produtos de Origem Animal

Departamento de Microbiologia e Parasitologia/UFF

---

Prof. Dr. Flávio Fernando Batista Moutinho

Doutor em Medicina Veterinária

Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública/UFF

---

Prof. Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira

Doutor em Ciências

Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos/Fiocruz

“Entregue o seu caminho ao Senhor, confie nele, e ele agirá.”

Salmos 37:5

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e capacitar nesses 4 anos, me permitindo chegar até aqui e me sustentando em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e por me apoiarem e me incentivarem a aprender cada vez mais e aos meus queridos avôs que já se foram, pelo amor, pelas lembranças alegres deixadas e por ensinarem o quão fortes precisamos ser diante das dificuldades.

Ao meu marido, meu companheiro de jornada e amigo, pelo amor, por não medir esforços em me fazer feliz e incentivar sempre a buscar o meu melhor.

Ao meu orientador, Dr. Rodrigo Menezes, por me receber como sua aluna há 9 anos atrás quando ingressei na Fiocruz e confiar no meu trabalho e desempenho ao longo de todos esses anos. Anos estes, que me fizeram aprender e crescer como pessoa e profissionalmente. Agradeço por ter sido esse orientador sempre disponível a me ensinar e auxiliar.

À Dra. Fernanda Morgado, pelo acompanhamento fundamental ao longo dos seminários e por cada consideração, sugestão e correção que com certeza fizeram minha tese melhor.

Aos técnicos Luiz Cláudio Ferreira e Francisco Rodrigues, pela fundamental colaboração e apoio durante a execução das técnicas histológicas.

À Dra. Monique Paiva de Campos, Dr. Otavio de Melo Espíndola, Dra. Rafaela Vieira Bruno e a doutoranda Rayane Teles de Freitas pela colaboração e fundamental apoio na realização da qPCR.

Ao Dr. Maurício Gauterio Dasso e Dr. Rogerio Oliveira Rodrigues pela colaboração e fundamental apoio na realização da sorologia no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor.

À Dra. Jane Megid e Dra. Vanessa Pelícia pela colaboração e fundamental apoio na realização da qPCR na UNESP.

A toda equipe do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos pela amizade e apoio de sempre.

À agência de fomento à pesquisa, FAPERJ, Edital Cientista do Nosso Estado (Processo E-26/203.069/2016) e o CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa, à Fiocruz pela bolsa concedida durante esses 4 anos e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento do curso.

Aos funcionários da secretaria do curso de pós-graduação pela atenção e ajuda para solucionar qualquer problema.

A todos, que contribuíram indiretamente para a realização desse estudo, me ajudando de alguma forma a chegar nessa etapa acadêmica. Muito obrigada!

Boechat V. C. **Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella canis* em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e alterações histológicas associadas no trato genital.** Rio de Janeiro, 2019, 107 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

## RESUMO

No estado do Rio de Janeiro a brucelose canina causada pela bactéria *Brucella canis* assume crescente importância, sendo um risco potencial para os criadores nos cães e proprietários dos cães. Recentemente, em estudo piloto, cães domiciliados do município de Barra Mansa foram soropositivos para infecção por *B. canis* bem como eram coinfectados por *Leishmania infantum*, protozoário causador da leishmaniose visceral canina (LVC). A infecção por *L. infantum* é responsável pelo surto recente de LVC em Barra Mansa com casos humanos e caninos. Entretanto, há uma carência de estudos sobre a coinfeção desses dois agentes em cães. Portanto, os objetivos desse estudo foram avaliar a ocorrência de *B. canis* e *L. infantum* em órgãos do trato genital masculino e feminino de cães e comparar os sinais clínicos, as alterações histológicas e a carga parasitária no trato genital de cães monoinfectados por *L. infantum* com os coinfectados por *L. infantum* e *B. canis*. Com essa finalidade, 70 cães sorologicamente positivos para *L. infantum* (45 machos e 25 fêmeas), provenientes do município de Barra Mansa, foram submetidos à exame clínico, coleta de sangue, seguida da eutanásia e necropsia. Na necropsia, foram coletadas amostras teciduais de epidídimo, testículo, próstata, vulva, vagina e útero, sendo submetidas à cultura parasitológica seguida da técnica de eletroforese *multilocus* para a identificação de *L. infantum*, qPCR para detecção de DNA de *Brucella* e *L. infantum* e técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica para o diagnóstico de *Leishmania* spp. e identificação das alterações histológicas associadas. Amostras dos soros foram submetidas à técnica de imunodifusão em gel de ágar para detecção de anticorpos anti-*B. canis*. No trato genital, 25 (100%) fêmeas e 44 (98%) machos foram positivos para *L. infantum*, com frequência de positividade de 98% nos epidídimos, 92% nas vulvas, 92% nas vaginas, 91 % nos testículos, 84% nos úteros e 66% nas próstatas. A viabilidade desse parasito no trato genital foi confirmada em 69% dos machos e 64% das fêmeas pelas técnicas parasitológicas. As cargas parasitárias mais intensas foram observadas no testículo, seguida pela vulva, epidídimo e vagina, porém sem diferença estatisticamente significativa entre esses tecidos. A carga de *L. infantum* na próstata foi significativamente inferior à dos demais órgãos do trato genital masculino e feminino. Apenas a carga parasitária na vagina foi significativamente associada ao número de sinais clínicos. A frequência do infiltrado inflamatório foi muito superior nos tecidos nos quais houve detecção de formas viáveis do parasito. Apenas nos testículos e epidídimo a reação inflamatória foi significativamente mais intensa nos cães com maior carga parasitária nesses tecidos. Nos testículos, além da orquite foi observada degeneração testicular, atrofia, ausência de espermatogênese, fibrose e necrose. As altas ocorrência e viabilidade, além da semelhança de carga nos cães machos e fêmeas sugerem a possibilidade de transmissão bidirecional de *L. infantum*. Anticorpos anti-*B. canis* foram detectados em três cães polissintomáticos, de ambos os sexos. Um desses cães apresentou carga de *L. infantum* na próstata superior à carga detectada em outras amostras de próstata de cães monoinfectados por *L. infantum*. Esses achados alertam para o potencial epidemiológico de coinfeção de *L. infantum* com *B. canis* associado à possibilidade de transmissão bidirecional de *L. infantum*.

**Palavras-chave:** 1. Trato genital. 2. *Brucella canis*. 3. *Leishmania infantum*. 4. Coinfeção. 5. qPCR. 6. Histopatologia.

Boechat V C. **Occurrence of anti-*Brucella canis* antibodies in dogs naturally infected by *leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract.** Rio de Janeiro, 2019, 113 f. Doctor [Science thesis in Clinic Research in Infectious Diseases] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

## ABSTRACT

In the State of Rio de Janeiro, canine brucellosis caused by the bacteria *Brucella canis* assumes increasing importance, being a potential risk for breeders and owners of dogs. Recently, in a pilot study, domiciled dogs from the municipality of Barra Mansa were seropositive for *B. canis* infection as well as were coinfecting with the protozoan *Leishmania infantum*, which causes canine visceral leishmaniasis (CVL). The infection by *L. infantum* is responsible for the recent outbreak of CVL in Barra Mansa with human and canine cases. However, there is a lack of studies on the co-infection of these two agents in dogs. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the occurrence of *B. canis* and *L. infantum* in male and female genital tract organs of dogs, and to compare clinical signs, histological changes, and parasitic load of *L. infantum* in the genital tract of dogs monoinfected by *L. infantum* with that coinfecting with *B. canis* and *L. infantum*. For this purpose, 70 dogs (45 males and 25 females) serologically positive for *L. infantum* and from the city of Barra Mansa were submitted to clinical examination, blood collection, followed by euthanasia and necropsy. At necropsy, tissue samples of the epididymis, testis, prostate, vulva, vagina and uterus were collected and submitted to parasitological culture followed by multilocus electrophoresis for identification of *L. infantum*, qPCR for detection of *Brucella* and *L. infantum* DNA and histopathology and immunohistochemistry techniques for the diagnosis of *Leishmania* spp. and identification of associated histological alterations. Serum samples were submitted to the agar gel immunodiffusion technique for the detection of anti-*B. canis* antibodies. In the genital tract, 25 (100%) females and 44 (98%) males were positive for *L. infantum*, with a 98% positivity in the epididymis, 92% in the vulvae, 92% in the vagina, 91% in the testes, 84 % in the uterus and 66% in the prostate. The viability of this parasite in the genital tract was confirmed in 69% of males and 64% of females by parasitological techniques. The most intense parasitic loads were observed in the testis, followed by the vulva, epididymis and vagina, but with no statistically significant difference between these tissues. The load of *L. infantum* on the prostate was significantly lower than that of the other organs of the male and female genital tract. Only the parasitic load in the vagina was significantly associated with the number of clinical signs. The frequency of inflammatory infiltrate was much higher in tissues in which detection of viable forms of the parasite was detected. Only in the testes and epididymis, the intensity of the inflammatory reaction was significantly higher in dogs with higher parasite load in these tissues. Testicular degeneration, atrophy, absence of spermatogenesis, fibrosis and necrosis were observed in the testes. The high occurrence, viability as well as the similarity of *L. infantum* loads in the genital tract of males and females dogs suggest the possibility of bidirectional transmission of *L. infantum*. Anti-*B. canis* antibodies were detected in three polysymptomatic dogs of both sexes. One of these dogs had higher *L. infantum* load in the prostate than that ones detected in other prostate samples of dogs monoinfected by *L. infantum*. These findings point to the epidemiological potential of *B. canis* and *L. infantum* coinfection associated with the possibility of bidirectional transmission of *L. infantum*.

**Keywords:** Genital tract. 2.*Brucella canis*. 3.*Leishmania infantum*. 4.Coinfection. 5.qPCR. 6.histopatology.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1.1 Leishmaniose</b> .....	13
<u>1.1.1 Leishmaniose visceral canina (LVC)</u> .....	13
<u>1.1.2 Epidemiologia</u> .....	14
<u>1.1.3 Diagnóstico da infecção por <i>L. infantum</i></u> .....	15
1.1.3.1 Diagnóstico clínico .....	15
1.1.3.2 Diagnóstico parasitológico .....	16
1.1.3.3 Diagnóstico sorológico .....	17
1.1.3.4 Diagnóstico molecular .....	18
<u>1.1.4 Patogenia da LVC</u> .....	19
<u>1.1.5 Carga parasitária relacionada à infecção por <i>L. infantum</i> no trato genital em cães</u>	20
<b>1.2 Brucelose</b> .....	20
<u>1.2.1 Brucelose canina</u> .....	21
<u>1.2.2 Epidemiologia</u> .....	22
<u>1.2.3 Diagnóstico da infecção por <i>Brucella canis</i></u> .....	25
1.2.3.1 Diagnóstico clínico .....	25
1.2.3.2 Diagnóstico bacteriológico .....	25
1.2.3.3 Diagnóstico sorológico .....	26
1.2.3.4 Diagnóstico Molecular .....	26
1.2.3.5 Diagnóstico histológico .....	27
<u>1.2.4 Patogenia da brucelose</u> .....	27
<b>1.3 Coinfecção entre <i>Brucella</i> spp. E <i>L.infantum</i></b> .....	28
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	29
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	31
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	31
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	31
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
<b>4.1 Desenho do estudo</b> .....	32
<b>4.2 Casuística</b> .....	32
<b>4.3 Critérios de elegibilidade</b> .....	32
<u>4.3.1 Critérios de inclusão</u> .....	32
<u>4.3.2 Critérios de Exclusão</u> .....	33



<b>4.4 Exame clínico e coleta das amostras</b> .....	33
<b>4.5 Diagnóstico parasitológico</b> .....	34
4.5.1 <u>Cultura Parasitológica</u> .....	34
4.5.2 <u>Histopatologia e Imuno-histoquímica</u> .....	34
<b>4.6 Diagnóstico molecular</b> .....	35
4.6.1 <u>Extração de DNA</u> .....	35
4.6.2 <u>Quantificação por fluorimetria</u> .....	36
4.6.3 <u>qPCR para <i>Brucella</i> sp.</u> .....	36
4.6.4 <u>qPCR para <i>L. infantum</i></u> .....	37
4.6.4.1 <u>Confeção de curva-padrão para a determinação do número de cópias do genoma de <i>L. infantum</i></u> .....	37
4.6.4.2 <u>Amplificação de DNA por qPCR</u> .....	38
<b>4.7 Diagnóstico sorológico</b> .....	38
<b>4.8 Análise estatística</b> .....	39
<b>5 RESULTADOS</b> .....	40
5.1 <b>Sinais clínicos</b> .....	40
5.2 <b>Frequência de <i>L. infantum</i></b> .....	40
5.3 <b>Carga parasitária de <i>L. infantum</i></b> .....	41
5.4 <b>Achados histopatológicos</b> .....	43
5.5 <b>Avaliação da frequência de <i>Brucella</i> spp.</b> .....	47
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	57
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	58
<b>APÊNDICE A</b> .....	75
<b>APÊNDICE B</b> .....	97

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Frequências de positividade para *Leishmania* em amostras do trato genital de cães machos e fêmeas naturalmente infectados por *L. infantum* detectadas pelas técnicas de PCR quantitativo (qPCR), histopatologia (HP), imuno-histoquímica (IHQ) e cultura parasitológica (CP), agosto de 2015 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....41
- Figura 2 - Carga parasitária de *L. infantum* expressa em logaritmo natural do equivalente genômico/nanograma de DNA (gEq/ng) no testículo, epidídimo, próstata, vulva, vagina e útero de cães naturalmente infectados, agosto de 2015 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....42
- Figura 3 - Achados histopatológicos no trato genital masculino de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, agosto de 2015 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....44
- Figura 4 - Achados histopatológicos no trato genital feminino de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, agosto de 2015 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....45

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Inquéritos sorológicos realizados em diversas regiões do Brasil quanto à presença de anticorpos anti-*B. canis* em cães, no período de 1976 a 2013.....24
- Tabela 2 - Carga de *L. infantum* no trato genital de acordo com a classificação clínica em cães naturalmente infectados, agosto de 2015 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....43
- Tabela 3 - Alterações histológicas em cada tecido do trato genital de cães naturalmente infectados por *L. infantum* de acordo com resultados de exames parasitológicos, agosto de 2015 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....46
- Tabela 4 - Intensidade inflamatória de acordo com a carga de *L. infantum* em amostras do trato genital de cães naturalmente infectados, agosto de 2015 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....47
- Tabela 5 - Descrição de sexo, raça e idade, sinais clínicos, alterações histológicas, positividade e carga de *Leishmania* no trato genital de três cães soropositivos para anticorpos anti-*B. canis*, agosto de 2015 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).....48

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – Soro albumina bovina

Ceua – Comissão de Ética no Uso de Animais

Cq – Ciclo de quantificação

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DPP® – Teste rápido de imunocromatografia de duplo percurso/*Dual-Path platform technology*

Elisa – Ensaio imunoenzimático

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

gEq – Equivalente genômico

HE – Hematoxilina-eosina

HIV – Vírus da imunodeficiência humana/ *Human Immunodeficiency Virus*

HP – Histopatologia

IDGA – Imunodifusão em gel de ágar.

IDGA-ME – Imunodifusão em gel de ágar - 2-mercaptoetanol.

IFN- $\gamma$  – Interferon- $\gamma$

Ig – Imunoglobulina

IHQ – Imuno-histoquímica

IL – Interleucina-2

INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

kDNA – DNA do cinetoplasto

Lacen – Laboratório Central de Saúde Pública

LAPCLIN-DERMZOO – Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos

LV – Leishmaniose visceral

LVC – Leishmaniose visceral canina

MIN – Minutos

NNN – Novy, MacNeal e Nicolle

NO – Óxido nítrico

PBS – Tampão fosfato salino/*phosphate buffered saline*

PCR – Reação em cadeia da polimerase /*Polymerase chain reaction*

pH – Potencial hidrogeniônico

qPCR – PCR quantitativa

Rifi – Reação de imunofluorescência indireta

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa

TARP – Teste de aglutinação rápida em placa.

TARP-ME – Teste de aglutinação rápida com 2-mercaptoetanol

TAT – Teste de aglutinação em tubo.

TGF- $\beta$  – Fator de transformação do crescimento- $\beta$

Th – T auxiliar/T *helper*

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral- $\alpha$

VDRL – Teste para identificação de paciente com sífilis/Venereal Disease Research Laboratory

°C – Graus Celsius

® – Marca registrada

TM – Marca não registrada/ *Trademark*

$\mu$ L – Microlitro

mL – Mililitro

ng – Nanograma

nM – Nanomolar

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Leishmaniose

As leishmanioses são consideradas primariamente como antropozoonoses, podendo acometer o ser humano quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do protozoário parasito causador dessas doenças. Elas representam um problema de saúde pública, composto por um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Protozoários do gênero *Leishmania*, incluindo aproximadamente 30 espécies de parasitos que infectam seres humanos e animais, são os agentes etiológicos das leishmanioses (GRAMICCIA; GRADONI, 2005; BAÑULS et al., 2007; WHO, 2010). Nas Américas, de acordo com a espécie envolvida, as leishmanioses se subdividem em leishmaniose tegumentar americana e leishmaniose visceral americana (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

### 1.1.1 Leishmaniose visceral canina (LVC)

A leishmaniose visceral zoonótica é causada pelo protozoário *L. infantum*. A principal forma de transmissão do parasito para humanos, cães e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor biológico do protozoário *L. infantum* no Brasil (GONTIJO; MELO, 2004; READY, 2013). Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório, pois apresenta intenso parasitismo cutâneo, estreito contato com humanos e serve, principalmente, de fonte de alimento, atraindo a presença do flebotomíneo transmissor. O vetor, face às condições ambientais como temperatura, umidade e presença de matéria orgânica tem condições de se manter, facilitando a transmissão para outros animais e humanos (MOLINA et al., 1994; GIUNCHETTI et al., 2006; WHO, 2010). Devido à importância do cão no ciclo da leishmaniose visceral (LV), o Ministério da Saúde (2006b) preconiza, de acordo com a Portaria Interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008, a eutanásia do cão infectado por *L.*

*infantum*. Ademais, é proibido o tratamento dos mesmos com fármacos usados no tratamento da leishmaniose em humanos, pois aumentaria o risco para seleção de parasitas resistentes ao medicamento em humanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Apesar da clássica transmissão pela picada de flebotomíneos infectados, a doença pode ser transmitida por via venérea ou vertical, assim como a bactéria *Brucella canis*, causadora da brucelose canina (GODOY et al., 1977; KIM et al., 2006; KEID et al., 2007b; MEGID et al., 2008; DINIZ et al., 2005; SILVA et al., 2009; BENITES et al., 2011; VIDA et al., 2016). Em pesquisa realizada por Boechat et al. (2016) em 40 cães positivos para *L. infantum*, esse parasito foi detectado no trato genital masculino de 45% e no feminino de 40% dos cães. Adicionalmente, nessa pesquisa o protozoário *L. infantum* esteve associado à inflamação granulomatosa e necrose, sobretudo nos testículos, epidídimo e vulva, acometendo também útero, vagina, ovário, tubas uterinas, glândulas mamárias, próstata e glande. Outros autores também detectaram reação inflamatória granulomatosa composto principalmente por macrófagos, plasmócitos e linfócitos associadas à presença de formas amastigotas de *Leishmania*, particularmente no epidídimo, prepúcio, glande e testículos (DINIZ et al., 2005; AMARA et al., 2009; BENITES et al., 2011; MANNA et al., 2012) e em menor escala na próstata (MIR et al., 2012), assim como na vulva e vagina (SILVA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2016b; MAGRO et al., 2017).

### 1.1.2 Epidemiologia

As leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas, altamente influenciadas por fatores sociais e ambientais e são endêmicas em 98 países e territórios. Os focos importantes de LV causada por *L. infantum* incluem a bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia ocidental e América Latina, predominando no Brasil (WHO, 2010; ALVAR et al., 2012).

No mundo, há uma incidência estimada de 0,5 milhões de casos de LV humana registrados anualmente. Mais de 90% dos casos da doença estão concentrados em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão, provocando um número estimado de mais de 50.000 óbitos por ano, uma taxa superada, dentre as doenças parasitárias, apenas pela malária (WHO, 2010; ALVAR et al., 2012). Além disso, a LVC é emergente na América do Norte (MAIA; CAMPINO, 2012).

O Brasil enfrenta atualmente a expansão geográfica e urbanização da LV com casos humanos e caninos em várias cidades de grande e médio porte (MAIA-ELKYHOURY et al., 2008; WERNECK, 2008; COURA-VITAL et al., 2011; HARHAY et al., 2011; TONINI et al., 2012; CARDIM et al., 2013; CASTRO-JÚNIOR, 2014, MAGRO et al., 2017)

As modificações ambientais causadas pelos humanos, o desmatamento, ocupação desordenada das periferias das grandes cidades por população de baixa ou nenhuma imunidade à infecção, presença significativa do reservatório e do vetor *L. longipalpis*, contribuíram para esse processo, promovendo o surgimento de novos focos ou reativação de antigos (GONTIJO; MELO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b; BORASCHI et al., 2007; MAIA-ELKYHOURY et al., 2008).

Nos últimos anos, verificou-se um aumento do número de casos de LVC, em alguns municípios como o Rio de Janeiro, Barra Mansa, Volta Redonda, Niterói, Maricá e Mangaratiba (Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro, 2013). Casos novos de infecção por *L. infantum* já foram registrados em alguns municípios desse estado, anteriormente livres da doença (CABRERA et al., 2003; SOUZA et al., 2009; DE PAULA et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2010a, DE CAMPOS et al., 2013).

Esse aumento no número de casos de infecção por *L. infantum* em cães e sua expansão para áreas anteriormente indenes, com aparecimento de novos casos de LV em humanos reflete a fragilidade do controle da doença no estado do Rio de Janeiro.

### 1.1.3 Diagnóstico da infecção por *L. infantum*

#### 1.1.3.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da LVC é difícil devido à variedade de sinais clínicos, que incluem linfadenomegalia generalizada, perda de pelos ao redor dos olhos, nariz, boca e orelhas, lesões de pele com ou sem descamações, e às vezes, úlceras, perda de apetite, apatia, emagrecimento, onicogribose, dificultando a locomoção, febre, distúrbios de coagulação, lesões renais e hepáticas (FEITOSA et al., 2000; SARIDOMICHELAKIS; KOUTINAS, 2014).



A prevalência da infecção em cães em áreas endêmicas pode chegar a 50% ou mais, porém a prevalência da doença clínica ocorre entre 3% e 10% (GOMES et al., 2008), demonstrando que a maioria dos cães infectados não desenvolve sintomas, o que dificulta ainda mais o diagnóstico. Portanto, uma variedade de testes laboratoriais tem sido utilizada para detectar a infecção por *L. infantum* em cães, como testes sorológicos, cultura parasitológica em meio bifásico, citologia, histopatologia, imuno-histoquímica, reação em cadeia da polimerase (PCR) e hibridização *in situ* (TAFURI et al., 2004; MAIA; CAMPINO, 2008; MIRÓ et al., 2008; MENEZES et al., 2013). Entretanto, a sensibilidade dos métodos de diagnóstico de *L. infantum* varia consideravelmente em função de inúmeros aspectos, limitando o uso isolado desses métodos, especialmente em cães assintomáticos (MOREIRA et al., 2007; GOMES et al., 2008; MIRÓ et al., 2008; OTRANTO et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2010b; GRIMALDI et al., 2012; FERREIRA et al., 2012). Dessa forma, deve-se buscar melhorar a acurácia no diagnóstico da infecção de cães com *L. infantum*.

#### 1.1.3.2 Diagnóstico parasitológico

Para o diagnóstico parasitológico a demonstração do parasito pode ser feita em material obtido por biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos e biópsia ou escarificação de pele (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b; SOUZA et al., 2014). O material obtido pode ser utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas, histologia ou isolamento em meios de cultura (SUNDAR; RAI, 2002). Entretanto, alguns dos procedimentos citados para obtenção de material são invasivos, podendo gerar riscos para o animal, além de serem impraticáveis em programas de saúde pública, nos quais um grande número de animais deva ser avaliado num período curto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b).

A cultura parasitológica seguida da utilização da técnica de eletroforese enzimática multilocus constitui o método de referência para caracterização de protozoários do gênero *Leishmania*. A cultura, devido sua especificidade de aproximadamente 100% (GONTIJO; MELO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006) e relativa sensibilidade, variando de 78,7% (n=310) (MADEIRA et al., 2009a) a 80,3% (n=51) (MADEIRA et al., 2006) é uma das técnicas mais tradicionais no contexto diagnóstico das leishmanioses. Todavia, os resultados da cultura parasitológica são demorados, além de ser uma técnica suscetível a contaminação

microbiológica e que pode ser de difícil realização devido a pobre adaptação de algumas espécies ao meio de cultura (MAIA et al., 2008).

A histopatologia (HP) e imuno-histoquímica (IHQ) são técnicas específicas para o gênero *Leishmania* e, diferentemente das técnicas citadas anteriormente, permitem a observação de formas amastigotas nos tecidos, embora apresentem uma menor sensibilidade do que as técnicas sorológicas, cultura parasitológica e PCR (QUEIROZ et al., 2011). A visualização do parasito nos tecidos é importante, pois permite a correlação dos parasitos com as lesões associadas e quantificação da carga parasitária (QUEIROZ et al., 2011). Entretanto, a HP e IHQ não permitem a identificação de *Leishmania* em nível de espécie.

#### 1.1.3.3 Diagnóstico sorológico

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi a técnica sorológica recomendada durante muitos anos pelo Ministério da Saúde para confirmação diagnóstica de LVC, apresentando em estudos sensibilidade de 83% a 100% (MANCIANTI et al., 1996; ALMEIDA et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 2010c).

Entretanto, de acordo com Faria e Andrade (2012) a aplicação da RIFI requer alto nível de habilidade, experiência, equipamento especializado e de alto custo, incluindo as diluições seriadas do soro que tornam a técnica trabalhosa e inviável para avaliar grande número de amostras. Além disso, uma das grandes desvantagens é a impossibilidade de automação, levando a interpretações subjetivas dos resultados, dificultando a repetibilidade em diferentes laboratórios (GRADONI, 2002; ROSATI et al., 2003). Já o ensaio imunoenzimático (ELISA), permite automação e utilização de valores de referência, apresentando vantagens nesse sentido (ROSATI et al., 2003).

As técnicas sorológicas também apresentam a limitação da baixa especificidade, por conta de possíveis reações cruzadas com outros tripanosomatídeos como *L. (Viannia) braziliensis*, *Trypanosoma cruzi* (ROSYPAL et al., 2005b; TRONCARELLI et al., 2009; ZANETTE et al., 2013) e *Trypanosoma caninum* (MADEIRA et al., 2009b).

Contudo, a utilização das técnicas imunocromatográficas abriu um novo panorama no diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães. Devido à facilidade, rapidez na execução e resultados satisfatórios, desde dezembro de 2011 o Ministério da Saúde substituiu o antigo protocolo de diagnóstico da LVC, recomendando o teste rápido de imunocromatografia de

duplo percurso (DPP®, Biomanguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) como exame de triagem e o ELISA (Biomanguinhos) como exame confirmatório dos casos positivos no DPP® (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

#### 1.1.3.4 Diagnóstico molecular

Para o diagnóstico molecular estão disponíveis métodos de hibridização *in situ* com sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa (RT-PCR) para detecção de RNA, assim como a PCR convencional e PCR quantitativa (qPCR) para detecção de DNA (GONTIJO; MELO, 2004; SOLCÀ et al., 2014). Dentre estas, a PCR convencional é a mais realizada, utilizando iniciadores desenhados para amplificar, por exemplo sequências conservadas encontradas em minicírculos que compõem o kDNA (DNA do cinetoplasto) de diferentes espécies de *Leishmania*. O cinetoplasto é conhecido por possuir milhares de cópias de minicírculos de DNA (SUNDAR; RAI, 2002).

Resultados variáveis com relação à sensibilidade da PCR e qPCR podem ser observados em diferentes amostras caninas. Fatores que podem explicar tais variações incluem a distribuição heterogênea dos parasitos em cada tecido, devido ao tropismo da cepa, além da resposta imune local (MAIA; CAMPINO, 2008; LOMBARDO et al., 2012; SOLCÀ et al., 2014).

Estudos têm descrito alta sensibilidade na detecção de pequenas cargas de parasitas, utilizando qPCR (MARY et al., 2004; FRANCINO et al., 2006; MANNA et al., 2009; SOLCÀ et al., 2014). Pela capacidade de ser uma técnica quantitativa, também é utilizada para monitorar a carga parasitária em tecidos de cães (MAIA; CAMPINO, 2008; MARTINEZ et al., 2011; GALLETTI et al., 2011). Em relação a PCR, algumas desvantagens devem ser consideradas, como o fato de ser uma técnica que não faz parte da rotina de muitos laboratórios, por conta da falta de padronização nos diferentes protocolos. Além disso, ainda apresenta alto custo operacional, há possibilidade de contaminação, além da não diferenciação entre doença e infecção (XAVIER et al., 2006; GOMES et al., 2008; QUEIROZ et al., 2011; DE ALMEIDA et al., 2011).

#### 1.1.4 Patogenia da LVC

Protozoários do gênero *Leishmania* podem infectar diferentes tipos de células, incluindo os do sistema fagocítico mononuclear, como macrófagos e células de kupffer, além de células dendríticas, fibroblastos, células endoteliais, hepatócitos, neutrófilos, eosinófilos e células neoplásicas (RODRÍGUEZ et al., 1996; MARCHAL et al., 1997; TAFURI et al., 2001; LEVY et al., 2006). Dessa forma, são capazes de invadir quase todos os tecidos e órgãos do corpo, incluindo o sistema nervoso central (VIÑUELAS et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2017).

Em cães infectados ocorre uma resposta imune mista do tipo Th1 (resposta imune celular) e Th2 (resposta imune humoral), sendo que o balanço entre essas respostas se inclina na direção Th2 em cães que evoluem para doença clínica. Por sua vez, uma atividade protetora mais forte Th1 direciona a resistência do hospedeiro frente ao parasita. As citocinas interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induzem a ativação de macrófagos e morte de parasitas por óxido nítrico (NO) na resposta Th1. Por outro lado, IL-10, fator de transformação do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e IL-4 estão envolvidos na disseminação do parasito associada ao aumento da atividade das células B e plasmócitos na produção de anticorpos relacionadas à resposta Th2 (BANETH et al., 2008). Essa resposta mista parece ocorrer tanto em cães assintomáticos quanto sintomáticos, sendo prevalente nos últimos, nos quais eventualmente resulta em danos nos tecidos via diferentes mecanismos patológicos (PANARO et al., 2009). Estes mecanismos são gerados como uma forma de compensar, porém sem eficácia, a incapacidade dos macrófagos de destruir o parasito em cães susceptíveis e incluem principalmente, inflamação granulomatosa (por exemplo, dermatite nodular, osteomielite), deposição de complexos imunes (por exemplo, glomerulonefrite), e/ou a produção de autoanticorpos (BANETH et al., 2012; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).

Na maioria dos casos, o infiltrado granulomatoso é acompanhado de um infiltrado linfoplasmocítico e/ou linfohistiocítico e, ocasionalmente, neutrofílico, especialmente nos estágios iniciais da doença (PINTO et al., 2011; VERÇOSA et al., 2012; MOMO et al., 2014).

No geral, a variabilidade clínica e a lesão tecidual subjacente à LVC refletem o resultado combinado de uma imunidade celular ineficiente, que conduz a uma inflamação granulomatosa compensatória e uma imunidade humoral hiperativa, que, eventualmente, resulta na deposição de complexos imunes nos tecidos alvo e/ou geração de autoanticorpos (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).

### 1.1.5 Carga parasitária relacionada à infecção por *L. infantum* no trato genital em cães

Um marcador mais preciso para avaliação da infectividade de cães pode ser fornecido pela carga parasitária, utilizando qPCR.

No trato genital masculino de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, testículo e epidídimo apresentaram carga parasitária mais elevada do que próstata, glândula, prepúcio e bolsa escrotal, estando ou não, associada a maior intensidade inflamatória (OLIVEIRA et al., 2016a; MANNA et al., 2012).

Já no trato genital feminino, ainda não foram detectadas diferenças entre os órgãos (cérvis, cornos e corpo uterino, ovário vagina e vulva) quanto à carga parasitária determinada por qPCR (OLIVEIRA et al., 2016b). Esses autores relatam que a carga parasitária não influenciou a intensidade de lesões inflamatórias crônicas nos órgãos genitais das cadelas naturalmente infectadas, exceto no corpo uterino ( $p=0.001$ ).

## **1.2 Brucelose**

A brucelose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Brucella*, tendo como hospedeiros naturais, animais domésticos tais como bovinos, bubalinos, ovinos, caprinos, suínos e cães e como hospedeiro acidental, os humanos (CORBEL, 2006; ISLAM et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2015).

As bactérias do gênero *Brucella* são coco bacilos gram-negativos, não capsulados, não esporulados e patógenos intracelulares facultativos que podem sobreviver e se multiplicar no interior de células fagocíticas do hospedeiro. Além disso, esses agentes podem persistir no ambiente quando em condições de alta umidade, baixa temperatura e ausência de luz solar direta. Essas condições ambientais favorecem a sobrevivência de *Brucella* por vários meses na água, fetos abortados, tecidos placentários, excrementos líquidos, feno, equipamentos e roupas (SAMMARTINO et al., 2005).

### 1.2.1 Brucelose canina

Os cães podem ser infectados por quatro das dez espécies de *Brucella* (*B. canis*, *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, excluindo *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti* e *B. inopinata*) (HOLLETT, 2006; KANG et al., 2014). As infecções em cães por *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* são de ocorrência esporádica e, geralmente, resultam do contato de cães da zona rural com produtos de origem animal ou ingestão de restos de abortamentos brucélicos (HOLLETT, 2006).

*Brucella canis* é uma bactéria zoonótica, de morfologia colonial rugosa ou mucoide, aeróbia e imóvel, tendo o cão como seu reservatório e uma predileção por tecidos produtores de esteroides como os testículos, epidídimos, próstata e útero. Em adição a estes tecidos, esta bactéria também pode ser encontrada nos olhos, coluna vertebral, fígado, baço e linfonodos de forma regular (HOLLETT, 2006; MAKLOSKI, 2011). A infecção se dá por contato com mucosa genital, oronasal e conjuntival ou por lesões na pele. O modo mais comum de transmissão é a venérea, embora os cães possam se infectar após exposição ou ingestão de membranas fetais infectadas, fetos abortados, descarga vaginal ou urina de cães infectados. As fêmeas podem também transmitir a doença por via transplacentária e pelo leite (GREENE; CARMICHAEL 2006; CORBEL, 2006).

Na cadela, o sinal clínico clássico da brucelose por *B. canis* é um aborto tardio (45-55 dias de gestação), resultando no nascimento de filhotes natimortos que muitas vezes estão autolisados. Nos machos, o principal sinal clínico é epididimite, podendo ocorrer atrofia testicular, orquite e uma dermatite úmida escrotal. O sêmen dos machos infectados, geralmente apresenta um grande número de espermatozoides anormais e células inflamatórias, especialmente durante os primeiros três meses após a infecção. Machos cronicamente infectados podem não ter esperma ou reduzido número de espermatozoides imaturos. Anticorpos autoimunes (antiespermatozoides) estão presentes e, provavelmente, contribuem para a infertilidade nos machos. Sinais clínicos inespecíficos em ambos os sexos incluem letargia, perda de libido, envelhecimento precoce, aumento generalizado dos linfonodos, osteomielite vertebral e discospondilite (HUBBERT et al., 1980; ANDERSON; BINNINGTON, 1983; SHIN; CARMICHAEL, 1999, KEID et al., 2017).

### 1.2.2 Epidemiologia

A infecção canina por *B. canis* tem sido mundialmente estudada desde seu primeiro relato nos Estados Unidos, quando Carmichael et al. (1966) identificaram essa bactéria como causadora de abortamento em cães. Há relatos de surtos por *B. canis* em cães no México, Argentina, Reino Unido, Europa, Canadá, Japão, China e Estados Unidos (YAMAUCHI et al., 1974; FLORES-CASTRO et al., 1977; TAYLOR, 1980; SEBEK et al., 1983; JIAN, 1992; BRENNAN et al., 2008; REYNES et al., 2012; GYURANECZ et al., 2013).

A prevalência mundial de infecção humana por *B. canis* não é conhecida, porém casos confirmados da doença têm sido relatados em países como Argentina, Estados Unidos, Turquia e Malásia (LUCERO et al., 2005a; 2008; 2010a; SAYAN et al., 2011a, 2011b; MANIAS et al., 2013; MARZETTI et al., 2013; DENTINGER et al., 2014; KRUEGER et al., 2014; BILMAN et al., 2014; MOHAMED ZAHIDI et al., 2015). Nesses estudos, a exposição ocupacional envolvendo os tratadores de canis, acidentes laboratoriais e o contato estreito entre proprietários e cães infectados com histórico de aborto foram considerados as fontes de infecção. A transmissão zoonótica ocorre por aerossóis, ingestão e contato com mucosas ou soluções de continuidade, sobretudo do trato genital de cães infectados (SANTOS et al., 2005). Brucelose humana causada por *B. canis* gera sinais inespecíficos geralmente semelhantes aos da brucelose causada por *B. abortus* e *B. melitensis*. Dentre as manifestações clínicas têm-se a febre (frequentemente periódica e noturna), fadiga, cefaleia, fraqueza, mal-estar, calafrio, sudorese, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia (PIAMPIANO et al. 2000; SCHEFTEL et al., 2003; LUCERO et al., 2010a; SAYAN et al., 2011a; MARZETTI et al., 2013). Apesar de a literatura relatar que em humanos as infecções por *B. canis* tendem a causar uma doença mais branda em comparação com outras espécies de *Brucella* spp., manifestações graves têm sido descritas. Estas incluem artrite séptica, osteomielite calvarial, abscesso epidural, efusão pleural, lesões orais, aneurismas em extremidades inferiores e endocardite (YING et al., 1999; MCKEE et al., 1999; PIAMPIANO et al., 2000; LUCERO et al., 2005b; MARZETTI et al., 2013). Pacientes imunocomprometidos em contato direto com cães infectados apresentam maior risco de infecção, como já descrito em dois casos humanos de brucelose por *B. canis* em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (LUCERO et al., 2010b; LAWACZECK et al., 2011).

No Brasil, a primeira identificação de *B. canis* ocorreu em Belo Horizonte, em 1976, a partir de isolamento do agente do sangue e de secreção vaginal de uma cadela com histórico de abortamento recente (GODOY et al., 1977). Estudos mais recentes com identificação, isolamento do agente e inquéritos sorológicos (Tabela 1) enfatizaram a importância clínica e epidemiológica do agente na população canina, além do seu potencial zoonótico. No estado do Rio de Janeiro, a brucelose é pouco investigada e os raros trabalhos sobre o tema relatam a soropositividade para *B. canis* nos cães em áreas urbanas, o que demonstra a circulação do agente e o risco da transmissão para os humanos (Tabela 1).



Tabela 1- Inquéritos sorológicos realizados em diversas regiões do Brasil quanto à presença de anticorpos anti-*B. canis* em cães, no período de 1976 a 2013.

Soroprevalência	Número de animais	Teste utilizado	Cidade/Estado	Autores
107 (45,34%)	236	IDGA	Belém, PA	Carvalho et al., 2000
167 (44,6%)	374	IDGA	Araguaína, TO	Dorneles et al., 2011
120 (28,9%)	416	IDGA	Natal, RN	Fernandes et al., 2013
44(25,7%)	171	IDGA,TARP	Rio de Janeiro e Niterói, RJ	Maia et al., 1999
90 (14,2%)	635	IDGA	Alfenas, MG	Almeida et al., 2004
23 (11,9%)	192	TAT	Porto Alegre, RS	Wald; Fernandes, 1976-1977
11 (9,2%)	119	IDGA	Rio de Janeiro, RJ	Moraes et al., 2001
30 (8,2%)	364	TARP	São Paulo, SP	Larsson et al., 1981
254 (7,5 %)	3386	IDGA	São Paulo, SP	Cortes et al., 1988
37 (7,4%)	497	IDGA	Rio de Janeiro, RJ	Marassi et al., 2003
5 (5,88%)	85	IDGA	Salvador, BA	Cavalcanti et al., 2006
19 (5,4%)	352	TARP-ME	Campinas, SP	Germano et al., 1986
1 (4,54%)	22	IDGA	Londrina, SP	Machado et al., 2013
4 (4,4%)	90	IDGA, IDGA-ME	Maceió, AL	Porto et al., 2008
8 (3,61%)	221	TAT	São Paulo, SP	Sandoval et al., 1976
11 (3,6%)	304	IDGA	Monte Negro, RO	Aguiar et al., 2005
6 (3,11%)	193	IDGA	Patos, PB	Fernandes et al., 2011
8 (2,53%)	316	IDGA	Rio de Janeiro, RJ	Ferreira et al., 2007
4 (2,35%)	170	IDGA	Campina Grande, PB	Vasconcelos et al., 2008
9 (2,2%)	410	IDGA,IDGA-ME, FC	Santana de Parnaíba, SP	Azevedo et al., 2003
19 (1,77%)	1072	TARP	Serra de Botucatu, SP	Moraes et al., 2002
1 (1,3%)	76	TARP	Belo Horizonte, MG	Godoy et al., 1977
9 (0,84%)	1072	TARP-ME	Serra de Botucatu, SP	Moraes et al., 2002

TAT: Teste de aglutinação em tubo. IDGA: Imunodifusão em gel de ágar. IDGA-ME: Imunodifusão em gel de ágar com 2-mercaptoetanol. TARP: Teste de aglutinação rápida em placa. TARP-ME: Teste de aglutinação rápida com 2-mercaptoetanol.

### 1.2.3 Diagnóstico da infecção por *Brucella canis*

#### 1.2.3.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da infecção é difícil devido à ausência de sinais específicos e a maioria dos cães não apresentarem sinais clínicos. No entanto, histórico de aborto e falhas na reprodução em um canil ou da população em que o animal está inserido levantam a suspeita clínica da doença (CAVALCANTI et al., 2006, KEID et al., 2017). Portanto, uma variedade de testes laboratoriais é utilizada para detectar a infecção por *B. canis* em cães: cultura bacteriana, testes sorológicos, IHQ e PCR (AZEVEDO et al., 2004; KEID et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011; GYURANECZ et al., 2011; HOFER et al., 2012; KANG et al., 2014; ARAS et al., 2014).

#### 1.2.3.2 Diagnóstico bacteriológico

A cultura bacteriológica é o método de referência para o diagnóstico de *B. canis*, pois permite o isolamento e identificação dessa bactéria, sendo de alta especificidade. Entretanto, a sua sensibilidade pode ser baixa em função de vários parâmetros como eliminação intermitente da bactéria, material mal coletado e mal conservado ou uso de antibióticos (MINHARRO et al., 2005, GREENE; CARMICHAEL, 2012). A bacteremia é detectada 2 a 4 semanas após a infecção e, se não for tratada, persiste por períodos longos (1 a 2 anos ou mais). Entretanto, a hemocultura não deve ser o único critério utilizado para diagnosticar a infecção, pois a bacteremia, embora geralmente sustentada, pode estar ausente ou ser intermitente em animais cronicamente infectados. Outra desvantagem importante é o cultivo ser restrito a instalações de biossegurança nível 3, destinados ao trabalho com agentes que acarretam elevado risco individual e moderado risco para a comunidade, sendo muitas vezes indisponíveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006a). Dessa forma, a hemocultura negativa não exclui a presença de infecção, porém o isolamento positivo confirma o diagnóstico.

### 1.2.3.3 Diagnóstico sorológico

A sorologia é o método diagnóstico mais utilizado para a detecção da infecção por *B. canis* em cães por conta da praticidade de execução, rapidez no processamento e possibilidade de exame de um grande número de amostras (JOHNSON; WALKER, 1992; GREENE; CARMICHAEL, 2012). Os testes comumente utilizados são a soro aglutinação rápida em lâmina, soro aglutinação lenta em tubo, imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e ELISA, sendo o IDGA o mais empregado. O compartilhamento de antígenos entre *B. canis* e *B. ovis* possibilita o emprego indistinto de reativos produzidos a partir de ambos os agentes para o diagnóstico sorológico da brucelose em ovinos e caninos. No Brasil, o IDGA para diagnóstico da infecção por *B. canis* em cães tem sido executado com antígeno constituído por proteínas e lipopolissacarídeos extraídos de *B. ovis* (AZEVEDO et al., 2004). Os testes por meio de IDGA detectam anticorpos circulantes até 36 meses após a bacteremia ter cessado, possibilitando o diagnóstico de animais cronicamente infectados (JOHNSON; WALKER, 1992; GREENE; CARMICHAEL, 2012). Entretanto, em infecções recentes, o diagnóstico fica prejudicado, pois anticorpos circulantes são detectados somente a partir de 8 a 12 semanas após a infecção, podendo ocorrer resultados falso-negativos (CARMICHAEL et al., 1989).

### 1.2.3.4 Diagnóstico Molecular

A técnica de PCR é um método rápido, sensível e específico para a detecção de *Brucella*, quando comparada com a cultura bacteriológica, uma vez que não depende da viabilidade bacteriana e nem é prejudicada pela presença de contaminantes (BRICKER, 2002; KEID et al., 2007a; ARAS; UÇAN, 2010). Recentemente, estudos foram desenvolvidos, utilizando novas técnicas de PCR capazes de discriminar *B. canis* de outras espécies de *Brucella* a partir de *swab* vaginal de cadelas, fetos abortados e sangue total. Essas técnicas apresentaram elevada sensibilidade, sendo uma alternativa para o isolamento bacteriano (ARAS et al., 2014; KANG et al., 2014; YANG et al., 2017). A técnica de PCR já foi utilizada com êxito na detecção de *Brucella* a partir de outras amostras biológicas como sêmen, linfonodos e medula óssea (KEID et al., 2007a; ARAS; UÇAN, 2010; FERNANDES

et al., 2011). Reação em cadeia da polimerase quantitativa também pode ser considerada uma ferramenta útil no diagnóstico de infecção por *B. canis*, apresentando sensibilidade variando de 16,67% a 92,31% e especificidade de 51,92% a 100%, em diferentes amostras biológicas de cães soropositivos positivos por IDGA (KAUFFMAN et al., 2014).

#### 1.2.3.5 Diagnóstico histológico

Achados histopatológicos envolvem reação inflamatória predominantemente granulomatosa ou piogranulomatosa, mas também linfocítica ou linfo-histiocítica podem ser observadas em todos os órgãos do trato genital feminino e masculino. Adicionalmente, pode ser observada vasculite necrosante na próstata, epidídimo, testículo, com subsequente atrofia ou fibrose uni ou bilateral. Além disso, endometrite subaguda a crônica pode ser detectada, com hiperplasia glandular e nódulos de células reticulares (GOMES et al., 1999; MEGID et al., 2002; HOLLETT, 2006; BRENNAN et al., 2008; GYURANECZ et al., 2011; GREENE; CARMICHAEL, 2012). Entretanto, os achados microscópicos no trato genital de cães associados a *Brucella* sp. não são patognomônicos e são comuns aos observados em cães infectados por *Leishmania infantum*, sendo a brucelose um importante diagnóstico diferencial na LVC.

Em relação à IHQ, já foi demonstrado seu importante uso na detecção de *Brucella* e *B. canis* a partir de amostra de placenta de cadelas com sinais clínicos (GYURANECZ et al., 2011; HOFER et al., 2012). Porém, sua utilização para detecção de *B. canis* é difícil pela falta de um anticorpo comercialmente disponível e a produção de anticorpos anti-*Brucella in house* é restrita a instalações de biossegurança nível 3 (BRENNAN et al., 2008).

#### 1.2.4 Patogenia da brucelose

Após a entrada no hospedeiro, a bactéria é fagocitada por macrófagos ou células dendríticas em migração e se disseminam pelos tecidos linfoides locais por meio de leucócitos, atingindo linfonodos, onde se multiplicam e podem permanecer por semanas a meses. Quando ocorre disseminação sistêmica, a *Brucella* atinge todo o organismo, incluindo

órgãos como baço, fígado, medula óssea, glândulas mamárias e órgãos reprodutivos e vários períodos de bacteremia podem ocorrer. Devido a essa bacteremia, esse patógeno pode alcançar outros tecidos, como discos intervertebrais ou formar complexos antígeno-anticorpo na úvea anterior dos olhos (uveíte), rins (glomerulopatia) e meninges (meningoencefalite) (HOLLETT, 2006; ZACHARY, 2013).

Resposta inflamatória aguda é desenvolvida, sendo os anticorpos da classe IgM os primeiros a serem produzidos, seguidos pelos anticorpos IgG, que persistem. Rapidamente a inflamação aguda é substituída por inflamação piogranulomatosa. A bactéria escapa dos mecanismos de degradação quando fagocitada por neutrófilos e macrófagos, sendo capaz de crescer e se replicar dentro dos macrófagos e células dendríticas, não ocorrendo fusão fagolisossomo, já que acidifica o fagossomo. O crescimento e a multiplicação bacteriana, acompanhados pela morte de macrófagos infectados geram inflamação piogranulomatosa nos tecidos genitais e em outros órgãos (ZACHARY, 2013).

### **1.3 Coinfecção entre *Brucella* spp. E *L. infantum***

Em humanos, há um relato, descrevendo a coinfecção entre *L. infantum* e *Brucella* sp. detectada em um homem de 27 anos de idade proveniente da província de Kerman no Irã, área considerada endêmica para brucelose e esporádica para leishmaniose visceral (FAKHAR et al., 2009). O paciente apresentava febre alta, calafrios, tosse úmida e dor abdominal. No exame físico, foi detectado esplenomegalia leve. Testes de diagnóstico como tuberculose, VDRL, HBsAg, HIV e vírus Epstein-Barr foram negativos. No entanto, os testes de Wright e Coomb foram positivos, confirmando a infecção por brucelose. Porém, após a duração normal do tratamento, nenhuma resposta foi observada e a febre não diminuiu, sendo suspeitado que o paciente tivesse leishmaniose visceral. O DNA de *L. infantum* foi detectado na biópsia hepática e no sangue total, usando nested PCR.

Portanto, as coinfecções por *Brucella* spp. e *L. infantum* podem ser frequentes e causar doença grave nos cães com aumento do potencial de transmissão zoonótica desses dois micro-organismos.

## 2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, a brucelose canina e humana resultante da infecção por *B. canis* é considerada subestimada em todo o mundo, incluindo o Brasil, que até o momento, não exige a notificação dos casos (LUCERO et al., 2005a; HOLLETT, 2006, MAPA, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Embora tenha ocorrido um progresso no controle da doença em muitos países, ainda há regiões onde a infecção persiste em cães domésticos (CORBEL, 2006; HOLST et al., 2012; TUEMMERS et al., 2013; KADEN et al., 2014; CHINYOKA et al., 2014; KRUEGER et al., 2014). Além disso, estudos relatam soropositividade e isolamento de *B. canis* em humanos, refletindo sua presença na população canina, uma vez que a infecção se dá principalmente, pelo contato direto com secreções do trato genital e material de aborto de cães infectados (LUCERO et al., 2005b, 2008, 2010a; SAYAN et al., 2011b; MARZETTI et al., 2013; DENTINGER et al., 2014; KRUEGER et al., 2014; MOHAMED ZAHIDI et al., 2015). Ademais, apesar dos sinais clínicos serem inespecíficos na maioria dos casos humanos, manifestações graves da doença já foram descritas (YING et al., 1999; MCKEE et al., 1999; PIAMPIANO et al., 2000; LUCERO et al., 2005b; MARZETTI et al., 2013).

A infecção por *B. canis* em cães tem sido crescentemente relatada em diferentes estados brasileiros, principalmente, em inquéritos sorológicos, ressaltando a discrepância de resultados de determinadas provas sorológicas, além do potencial zoonótico do agente (MELO et al., 1998; ALVES et al., 1999; MORAES et al., 2001; AZEVEDO et al., 2003; PORTO et al., 2008; DORNELES et al., 2011). As técnicas sorológicas para diagnóstico da infecção por *B. canis*, quando usadas isoladamente, apresentam falhas de sensibilidade, sugerindo a importância de se associar métodos diagnósticos mais específicos como a PCR, HP e IHQ (MINHARRO et al., 2005). Há poucos relatos, unindo essas técnicas à sorologia, o que permitiria um diagnóstico mais acurado além de uma correlação entre as lesões associadas e a carga bacteriana e, por conseguinte, um controle mais eficaz da doença (GYURANECZ et al., 2011; HOFER et al., 2012).

No estado do Rio de Janeiro, a brucelose canina assume crescente importância, representando um risco potencial para os criadores nos canis e proprietários dos cães (MAIA et al., 1999; MORAES et al., 2001; FERREIRA et al., 2007). Em um estudo piloto realizado no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI-Fiocruz),

11% (4/36) de cães parasitologicamente positivos para *L. infantum* apresentaram anticorpos anti- *B. canis*. Esses resultados demonstraram a ocorrência de coinfeção entre esses agentes infecciosos no município de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, área considerada endêmica para leishmaniose visceral canina (MELLO et al., 2014; FURTADO et al., 2015). As coinfeções no geral podem levar a uma grave imunossupressão acompanhada de uma exacerbação dos sinais clínicos, provocando dificuldades no diagnóstico e no controle dos agravos, sendo importante reconhecê-las (GREENE; CARMICHAEL, 2012). No caso da coinfeção de *B. canis* e *L. infantum* em cães, suspeita-se que pode haver como consequência da imunossupressão, uma elevação da carga parasitária desses dois agentes, provocando com isso um aumento do potencial de transmissão zoonótica desses dois micro-organismos.

Em humanos, já foi relatado coinfeção entre *L. infantum* e *Brucella* spp. no Irã (FAKHAR et al., 2009). Em outro estudo realizado em chacais (*Canis aureus*) da Sérvia, apesar da não observação de coinfeção, todos os canídeos que apresentaram DNA de *B. canis* pertenciam às mesmas localidades nas quais outros canídeos apresentaram DNA de *Leishmania* sp. (CIROVIĆ et al., 2014), sugerindo a possibilidade de coinfeção por esses agentes.

Entretanto, faltam estudos detalhados sobre a ocorrência de *B. canis* e alterações clínicas e histológicas associadas em cães em regiões endêmicas, como por exemplo, no estado do Rio de Janeiro, município de Barra Mansa. Além disso, é desconhecida a frequência de cães coinfectados por *B. canis* e *L. infantum* e lesões associadas nos órgãos genitais, que são sítios comumente infectados por esses agentes de importância em saúde pública. Desta forma, faz-se necessária uma associação entre os parâmetros clínicos, epidemiológicos, sorológicos, bacteriológicos e parasitológicos para um melhor conhecimento da coinfeção entre *B. canis* e *L. infantum* em cães e a importância da mesma na saúde pública.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*Brucella canis* em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e alterações histológicas associadas no trato genital.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a ocorrência de *B. canis* e *L. infantum* em órgãos do trato genital masculino e feminino;
- Descrever os sinais clínicos em cães monoinfectados por *L. infantum* e coinfectados por *L. infantum* e *B. canis* no trato genital;
- Comparar a frequência de positividade para *B. canis* e *L. infantum* pelas técnicas de diagnóstico utilizadas;
- Descrever as alterações histológicas no trato genital de cães monoinfectados por *L. infantum* e coinfectados por *L. infantum* e *B. canis* no trato genital;
- Avaliar a carga parasitária em cães infectados por *L. infantum* no trato genital.



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Desenho do estudo**

Foi realizado um estudo seccional em amostra de conveniência composta por 70 cães domiciliados (45 machos e 25 fêmeas), incluídos de agosto de 2015 a dezembro de 2016.

### **4.2 Casuística**

A população foi composta por 56 cães sem raça definida, 3 Pinschers, 3 Rottweilers, 2 Labradores Retrievers, 2 Cane Corsos, 2 Pastores Alemães , 1 Dachshund e 1 Pit Bull. A idade dos cães variou de 1 a 7 anos em 60 (86%), 8 a 11 anos em 7 (10%) e 12 a 14 anos em 3 (4%). Os cães foram provenientes do município de Barra Mansa (22°32'25,19"S e 44°10'35,33"O), estado do Rio de Janeiro, que é considerada uma área endêmica de LVC (Mello et al., 2014).

### **4.3 Critérios de elegibilidade**

#### 4.3.1 Critérios de inclusão

Cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania* no teste rápido de imunocromatografia de duplo percurso (DPP®) e no ensaio imunoenzimático (ELISA).

#### 4.3.2 Critérios de Exclusão

Ser castrado.

#### **4.4 Exame clínico e coleta das amostras**

Os cães foram testados previamente pela técnica de DPP pelas Secretaria Municipal de Saúde do município estudado e pela técnica de ELISA pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) do estado do Rio de Janeiro.

Os cães soropositivos foram encaminhados para eutanásia no LAPCLIN-DERMZOO como medida de controle preconizada pelo Ministério da Saúde (2006b). No LAPCLIN-DERMZOO, esses cães foram inicialmente submetidos a exame clínico por inspeção de pele, de mucosas oral e ocular, da genitália externa, palpação de linfonodos superficiais e órgãos abdominais. Foram considerados sinais clínicos de LVC: magreza ou caquexia, alopecia geral ou localizada, lesões cutâneas como úlceras e descamação, onicogribose, aumento de linfonodos superficiais, do fígado ou do baço à palpação, mucosas ocular ou oral hipocoradas e atrofia muscular esquelética (ALVAR et al., 1994; SOUZA et al., 2014). Os cães foram classificados em dois grupos de acordo com os sinais clínicos: com ausência ou poucos sinais clínicos (até três sinais clínicos de LVC) e com muitos sinais clínicos (mais de três sinais clínicos de LVC).

Após avaliação física, os cães foram submetidos à coleta de sangue por meio da punção da veia cefálica, sendo as amostras armazenadas em tubos de ensaio, identificadas e, após a coagulação, foram centrifugadas a 1125 xg e o soro separado e armazenado a -20°C para posterior realização da técnica de IDGA. Em seguida, os cães foram submetidos à eutanásia com dose excessiva de tiopental sódico por via endovenosa e necropsiados. Na necropsia, os órgãos foram avaliados macroscopicamente e foram coletadas amostras de tecidos do trato genital masculino (epidídimos direito e esquerdo, testículos direito e esquerdo e próstata) e feminino (vulva, vagina, corpo do útero). Foram coletados três fragmentos de cada tecido, sendo um submetido à cultura para identificação de *L. infantum*. Outro fragmento foi armazenado a -20°C para posterior submissão à qPCR para detecção de DNA de *Brucella* e *L. infantum*. Um terceiro fragmento foi fixado em formalina tamponada a 10% dentro de 48 horas para realização das técnicas de HP e IHQ.

Todos os procedimentos realizados nos cães foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ), licença LW-54/13.

## **4.5 Diagnóstico parasitológico**

### 4.5.1 Cultura Parasitológica

Os fragmentos teciduais dos órgãos genitais foram previamente mergulhados em solução salina estéril e semeados em meio de cultura bifásico NNN (Novy, MacNeal e Nicolle) / Schneider Medium Insect (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) contendo 10% de soro fetal bovino e incubadas a 26-28°C (MADEIRA et al., 2009a). As promastigotas de *Leishmania* isoladas foram identificadas como *L. infantum* por eletroforese enzimática multilocus, utilizando cinco sistemas enzimáticos (CUPOLILLO et al., 1994).

### 4.5.2 Histopatologia e Imuno-histoquímica

Os fragmentos fixados em formalina tamponada a 10% foram submetidos à técnica de processamento tecidual para inclusão em parafina. Cortes histológicos de 5 µm de espessura dos blocos de parafina foram colocados em lâminas não silanizadas para histopatologia e em lâminas silanizadas para imuno-histoquímica.

Para HP, cortes seriados foram obtidos dos blocos de parafina e corados pela hematoxilina-eosina (HE) (CARSON; HLADICK, 2015). Com o objetivo de avaliar a intensidade inflamatória, foi realizada uma classificação do infiltrado de macrófagos, plasmócitos e linfócitos em ausente ou leve (infiltrado celular ausente ou em pequenos focos e dispersos) e moderado a intenso (infiltrado celular denso e difuso).

Para IHQ, cortes seriados foram desparafinizados em xilol e reidratados em concentrações decrescentes de etanol. O bloqueio da peroxidase endógena foi feita em solução de peróxido de hidrogênio a 30% e metanol (45 mL de peróxido de hidrogênio e 55 mL de metanol) por 40 min a temperatura ambiente. A recuperação antigênica foi realizada

em tampão de citrato de sódio (pH = 6,0) a 65 °C durante 30 min em banho-maria. Para o bloqueio de ligações inespecíficas, os cortes foram incubados com a solução bloqueadora de proteínas Lab Vision™ Ultra V Block (Thermo Scientific, EUA) por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com soro de coelho policlonal anti-*Leishmania* na diluição de 1:500. O sistema de detecção de *Leishmania* foi baseado na reação da biotina, estreptavidina e peroxidase, a qual foi desenvolvida, usando o Kit UltraVision™ Plus Large Volume Detection System Anti-Polyvalente, HRP, Ready-to-use (Thermo Scientific™, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Cortes histológicos de tecidos intensamente parasitados com formas amastigotas de *Leishmania* foram incubados com soro homólogo não imune como controle negativo e com soro policlonal de coelho anti-*Leishmania* como controle positivo.

## **4.6 Diagnóstico molecular**

### 4.6.1 Extração de DNA

Foi realizada a extração de DNA, a partir de amostras genitais congeladas, utilizando o kit DNeasy® Blood & Tissue (Quiagen®, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de tecido foram transferidas para microtubos RB de 2 mL, sendo adicionada 180 µL de solução de lise e 20 µL de solução proteinase K. Em seguida as amostras foram incubadas em banho-seco a 56°C por 90 min, sendo ao final do período macerados os fragmentos teciduais restantes. Em seguida, as amostras foram alocadas numa plataforma semi-automática Qiacube (Quiagen®, Hilden, Alemanha) para extração de ácidos nucleicos, seguindo as instruções do fabricante.

As amostras de DNA foram identificadas com a data do processamento e conservadas a -20°C.

#### 4.6.2 Quantificação por fluorimetria

Esta técnica permite a quantificação de DNA, utilizando corantes fluorescentes, que são detectados pela plataforma Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen®) quando utilizado o kit Qubit® dsDNA HS Assay, seguindo as instruções do fabricante.

Para a quantificação, inicialmente foram estabelecidas curvas de concentração de DNA, utilizando os dois padrões do kit. Para a quantificação das amostras, foram adicionados 199 µL da solução de trabalho e 1 µL da amostra de DNA a ser quantificada e incubada a temperatura ambiente por dois minutos. Após a leitura no fluorímetro, a concentração de DNA em nanogramas por microlitro (ng/µL) foi definida através da curva-padrão, sendo os valores registrados. O limite mínimo de detecção desta metodologia foi de 0,0005 ng de DNA em 1 µl de diluente.

#### 4.6.3 qPCR para *Brucella* sp.

Foi utilizada plataforma StepOne™ (Applied Biosystems®) e o par de *primers* utilizados foram ITS66 (ACATAGATCGCAGGCCAGTCA) e ITS279 (AGATACCGACGCAAACGCTAC), específicos para *Brucella* spp., sendo cada amostra testada em duplicata. As reações foram realizadas num volume final de 25 µL, sendo 2 µL de amostra e 23 µL da mistura de reação, que contem 10,00 µL do reagente SYBR Green (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega, USA), 12,00 µL de H<sub>2</sub>O MiliQ autoclavada e 0,5 µL de cada primer. As reações foram realizadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems). Em cada placa de amplificação foram utilizados controles positivos e negativos.

A positividade foi confirmada se a amplificação da amostra teste apresentasse pico de “melt”, atingindo a temperatura do controle positivo (91,4°C). Se a amplificação com pico de “melt” fosse diferente do controle positivo (0,5 °C superior ou inferior), a amplificação seria considerada inespecífica e a amostra, negativa.

A técnica de qPCR foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular das Enfermidades Infecciosas da Universidade Estadual Paulista (FMVZ-UNESP, Botucatu, SP).

#### 4.6.4 qPCR para *L. infantum*

##### 4.6.4.1 Confeção de curva-padrão para a determinação do número de cópias do genoma de *L. infantum*

A quantificação de formas promastigotas de *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) (*sin. L. infantum*) utilizada para a curva padrão para a determinação do número de cópias genômicas foi feita, empregando uma cultura em fase exponencial de crescimento, utilizando o hemocitômetro de Neubauer.

Inicialmente, a amostra (cerca de 20 mL de cultura) foi lavada duas vezes em salina acrescida de fosfatos (PBS, pH 7,2) e retirada uma pequena alíquota (100 µl) para diluição (1:100), utilizando o corante Trypan Blue a 0,01%. Com o auxílio de uma micropipeta, a amostra foi colocada na subcâmara, preenchendo todo o quadrículo da câmara. A quantificação foi realizada na área dos 4 quadrantes, usualmente utilizada para contagem de glóbulos brancos, observando as linhas limites dessa área.

O número total de parasitos, expresso em mililitros (mL), foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Nº de parasitos/mL} = \text{número total de parasitos} / 4 \times 10^4 \text{ (fator de correção da câmara de Neubauer)} \times \text{diluição utilizada (100)}$$

Após a contagem, o número de parasitos foi ajustado para  $1 \times 10^6$  e centrifugado (7000 rpm/10 minutos/4°C). O sedimento foi estocado á -20°C até o momento da extração do DNA.

Para a extração do DNA de culturas de *L. infantum*, foi utilizado o kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Cada ponto da curva foi realizado em triplicata, utilizando-se 5 µL de cada diluição. Foram utilizadas as diluições referentes a 500, 50, 5, 0,5 e 0,05 gEq de *L. infantum*/µL, que representam os pontos de 2.500, 250, 25, 2,5, 0,25 gEq de *L. infantum*/reação de qPCR.

#### 4.6.4.2 Amplificação de DNA por qPCR

As amostras de DNA foram submetidas à amplificação, utilizando-se a plataforma StepOne™ (Applied Biosystems®) e sondas de hidrólise TaqMan®, sendo cada amostra testada em triplicata. A sonda de hidrólise (TaqMan® MGB) e os iniciadores foram desenhados para reconhecer as regiões conservadas do kDNA de *L. infantum*. Os iniciadores LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCAGTTTCCCGCC-3') e a sonda (FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-NFQ-MGB) que foram utilizados foram descritos anteriormente no protocolo de Francino et al. (2006).

As reações foram realizadas num volume final de 25 µL, sendo 5 µL de amostra e 20 µL da mistura de reação, que contem 12,5 µL do reagente Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), 1,5 µL dos iniciadores LEISH-1 e LEISH-2 a 900 nM, 2,5 µL da sonda a 200 nM e 2 µL de soro albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich®) numa concentração de 5 µg/µL. As reações foram realizadas em placa de 96 poços (Applied Biosystems). Em cada placa de amplificação foram utilizados controles positivos e negativos e o limiar basal de fluorescência para determinação do ciclo de quantificação (Cq) ou *threshold* fixado em 0,1. O ponto de corte para a definição dos resultados detectáveis foi fixado em 37 ciclos e amostras com Cq superior a 37 foram consideradas indetectáveis. O limite de detecção estabelecido a partir de repetições da curva-padrão com diluições seriadas foi de 0,0025 gEq de *L. infantum*/reação.

A técnica de qPCR foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular de Insetos (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ,RJ).

#### 4.7 Diagnóstico sorológico

As amostras de soro coletadas foram examinadas para a pesquisa de anticorpos anti-*B. canis* pela técnica de IDGA, utilizando antígeno de lipopolissacarídeos e proteínas solúveis extraídos da bactéria *B. ovis*, amostra Reo 198. A preparação e perfuração do gel, leitura em lâminas e interpretação do teste foram realizados de acordo com o protocolo obtido pelo fornecedor do antígeno (TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná). Além disso, para avaliar possível infecção por *B. abortus* foi realizado o teste do antígeno acidificado

tamponado (TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná). Caso o resultado no IDGA fosse reagente, o cão seria considerado coinfectado.

A sorologia foi realizada pelo Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul, RS.

#### **4.8 Análise estatística**

Os dados foram analisados por meio do R Project for Statistical Computing for Windows software (R Core team, 2018). Foram descritas frequências simples das seguintes variáveis: classificação clínica (sem ou poucos sinais e muitos sinais clínicos de LVC), positividade nas técnicas de diagnóstico e alterações histológicas. Boxplots foram usados para ajudar na comparação da carga parasitária nas diferentes amostras estudadas e foi utilizado o teste Mann-Whitney para comparar a carga parasitária entre os órgãos de machos e fêmeas, bem como para verificar a associação da carga parasitária com a intensidade de sinais clínicos e a intensidade inflamatória. A carga parasitária foi expressa em logaritmo natural do equivalente genômico/nanograma de DNA (gEq/ng), para modificar a escala devido a amplitude das variáveis e permitir a montagem do BoxPlot. No teste Shapiro-Wilk, foi rejeitada a normalidade para a variável das cargas parasitárias ( $p < 0,05$ ). O teste do coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a correlação entre as cargas de *L. infantum* nas amostras de trato genital examinadas. Para esse estudo, foi considerado o nível de significância foi de 5%.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Sinais clínicos

Ao exame físico, 59 (84,3%) cães apresentavam sinais clínicos: magreza (n=36), úlcera (n=34), alopecia (n=33), onicogribose (n=31), linfadenomegalia (n=31), descamação cutânea furfurácea (n=26), esplenomegalia (n=18), caquexia (n=12), ceratoconjuntivite (n=11) e hepatomegalia (n=4). Dos 59 cães, 34 apresentaram até 3 sinais clínicos e 25, mais de 3 sinais clínicos compatíveis com LVC.

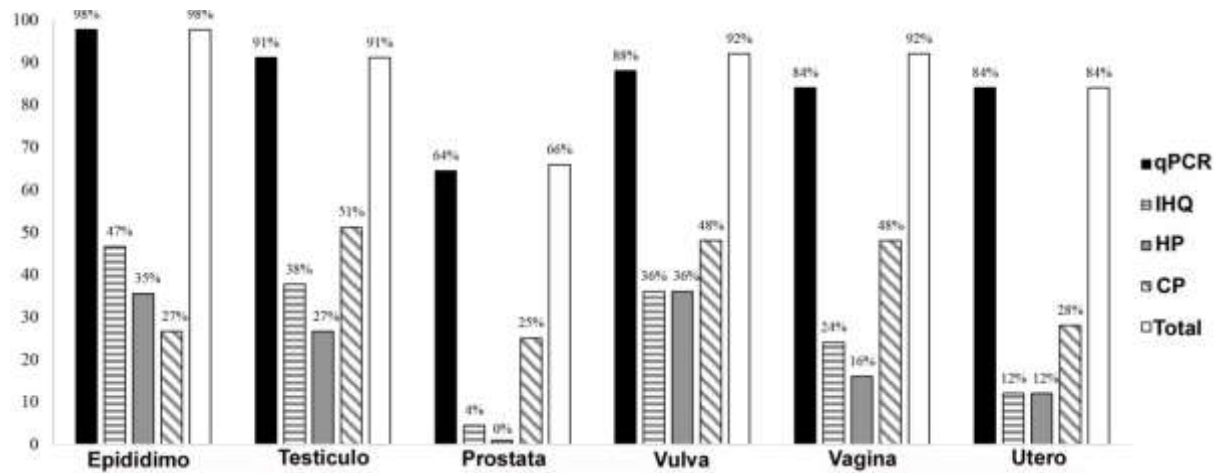
### 5.2 Frequência de *L. infantum*

No trato genital, 25 (100%) fêmeas e 44 (98%) machos foram positivos para *L. infantum* em pelo menos uma das técnicas de diagnóstico utilizadas (Figure 1). O único animal negativo em todas as técnicas foi um macho sem sinais clínicos. Não houve resultados da cultura parasitológica referentes a uma amostra de próstata por perda de material.

As técnicas parasitológicas em conjunto (cultura, HP e IHQ) detectaram formas viáveis (infecção ativa) de *Leishmania* no trato genital em 69% (n=31) dos machos e 64% (n=16) das fêmeas, sendo 58% (n=26) no testículo, 51% (n=23) no epidídimo, 27% (n=12) na próstata, 64% (n=16) na vagina, 56% (n=14) na vulva, e 32% (n=8) no útero. Nos 23 cães (13 machos e 9 fêmeas) nos quais os exames parasitológicos não detectaram *Leishmania* no trato genital, DNA de *L. infantum* foi detectado em pelo menos uma das amostras genitais.

Pela técnica de qPCR, DNA de *L. infantum* foi detectado em pelo menos uma amostra do trato genital de 98% dos machos (n=44,) e 96% das fêmeas (n=24). Quatro amostras, sendo uma de vulva, duas de vagina e uma de próstata foram negativas para DNA de *L. infantum*. Entretanto, essas amostras foram positivas para *Leishmania* por técnicas parasitológicas. Nesses casos, a espécie *L. infantum* foi identificada por MLEE nos isolados obtidos na cultura.

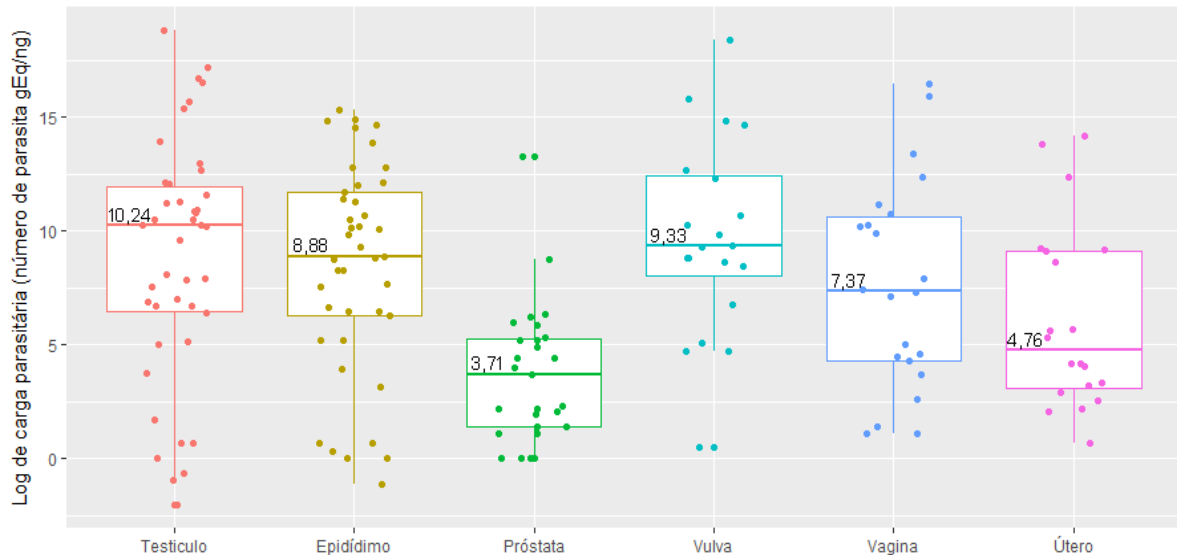
Figura 1- Frequências de positividade para *Leishmania* em amostras do trato genital de cães machos e fêmeas naturalmente infectados por *L. infantum* detectadas pelas técnicas de PCR quantitativo (qPCR), histopatologia (HP), imuno-histoquímica (IHQ) e cultura parasitológica (CP), agosto de 2015 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil).



### 5.3 Carga parasitária de *L. infantum*

A carga parasitária de *L. infantum* no trato genital masculino e feminino é descrita na Figura 2. Correlação positiva da carga parasitária foi observada entre testículo e epidídimo ( $r=0.80$ ,  $p<0.001$ ) e entre vulva e vagina ( $r=0.53$ ,  $p=0.01$ ).

Figura 2- Carga parasitária de *L. infantum* expressa em logaritmo natural do equivalente genômico/nanograma de DNA (gEq/ng) no testículo, epidídimo, próstata, vulva, vagina e útero de cães naturalmente infectados, agosto de 2015 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil)



Os valores nas linhas coloridas horizontais indicam a mediana da carga parasitária. As linhas verticais indicam o intervalo interquartil. Os pontos coloridos representam a carga parasitária de cada cão.

Não houve evidências estatísticas suficientes para afirmar diferença da carga parasitária entre testículo e epidídimo ( $p=0,665$ ), testículo e vulva ( $p=0,746$ ), testículo e vagina ( $p=0,292$ ), epidídimo e vulva ( $p=0,437$ ), epidídimo e vagina ( $p=0,484$ ), vagina e vulva ( $p=0,162$ ), vagina e útero ( $p=0,241$ ).

A carga de *L. infantum* detectada no testículo foi significativamente maior do que na próstata ( $p<0,001$ ) e no útero ( $p=0,037$ ). A carga de *L. infantum* detectada no epidídimo foi significativamente maior do que na próstata ( $p<0,001$ ). A carga detectada na próstata foi significativamente menor do que no útero ( $p=0,037$ ), vulva ( $p<0,001$ ) e vagina ( $p=0,002$ ). A carga detectada na vulva foi significativamente maior do que no útero ( $p=0,008$ ).

A comparação da carga parasitária de *L. infantum* no trato genital masculino e feminino entre o grupo sem ou com poucos sinais clínicos e o grupo com muitos sinais clínicos está descrita na tabela 2.

Tabela 2- Carga de *L. infantum* no trato genital de acordo com a classificação clínica em cães naturalmente infectados, agosto de 2015 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil)

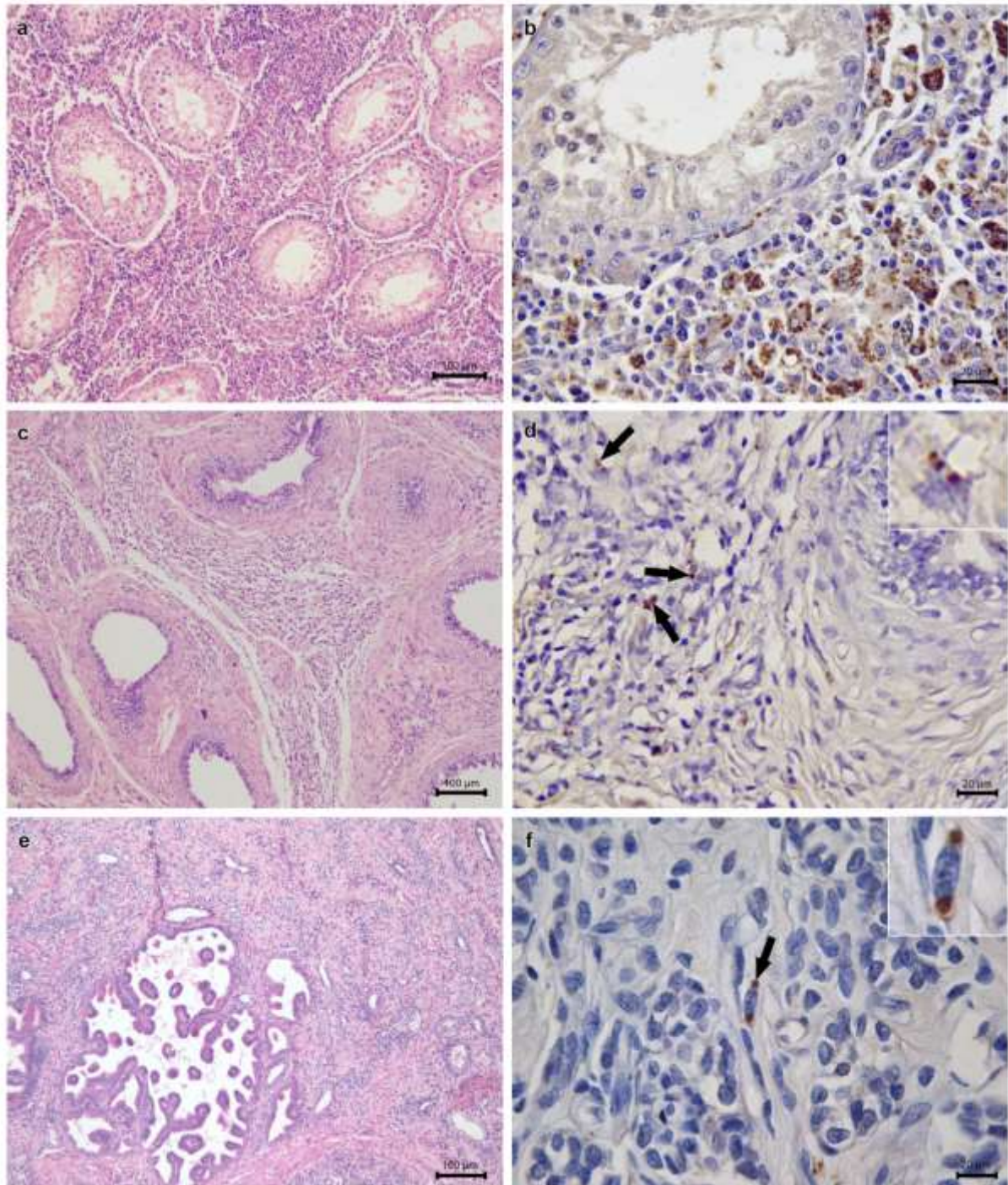
Amostras	Carga de <i>L. infantum</i> <sup>a</sup>				p-valor
	Cães sem ou com poucos sinais clínicos <sup>b</sup>		Cães com muitos sinais clínicos <sup>c</sup>		
	(n=45)		(n=25)		
	Mediana	Mínimo-Máximo	Mediana	Mínimo-Máximo	
Testículo	9,89	-0,68-16,74	10,52	-2,04-18,81	0,245
Epidídimo	9,04	-1,16-15,34	10,10	0,31-14,92	0,388
Próstata	4,38	1,39-8,76	4,01	1,10-13,27	0,504
Vulva	8,82	0,5-18,4	11,07	4,73-14,84	0,343
Vagina	6,08	1,1-15,92	10,96	4,26-16,49	<b>0,032</b>
Útero	4,75	0,69-13,82	6,57	3,18-14,18	0,364

<sup>a</sup>Carga parasitária de *L. infantum* expressa em logaritmo natural do equivalente genômico/nanograma de DNA (gEq)/ng. <sup>b</sup>Poucos sinais clínicos: até três sinais clínicos compatíveis com leishmaniose visceral. <sup>c</sup>Muitos sinais clínicos: mais de três sinais compatíveis com leishmaniose visceral. n= número de cães.

#### 5.4 Achados histopatológicos

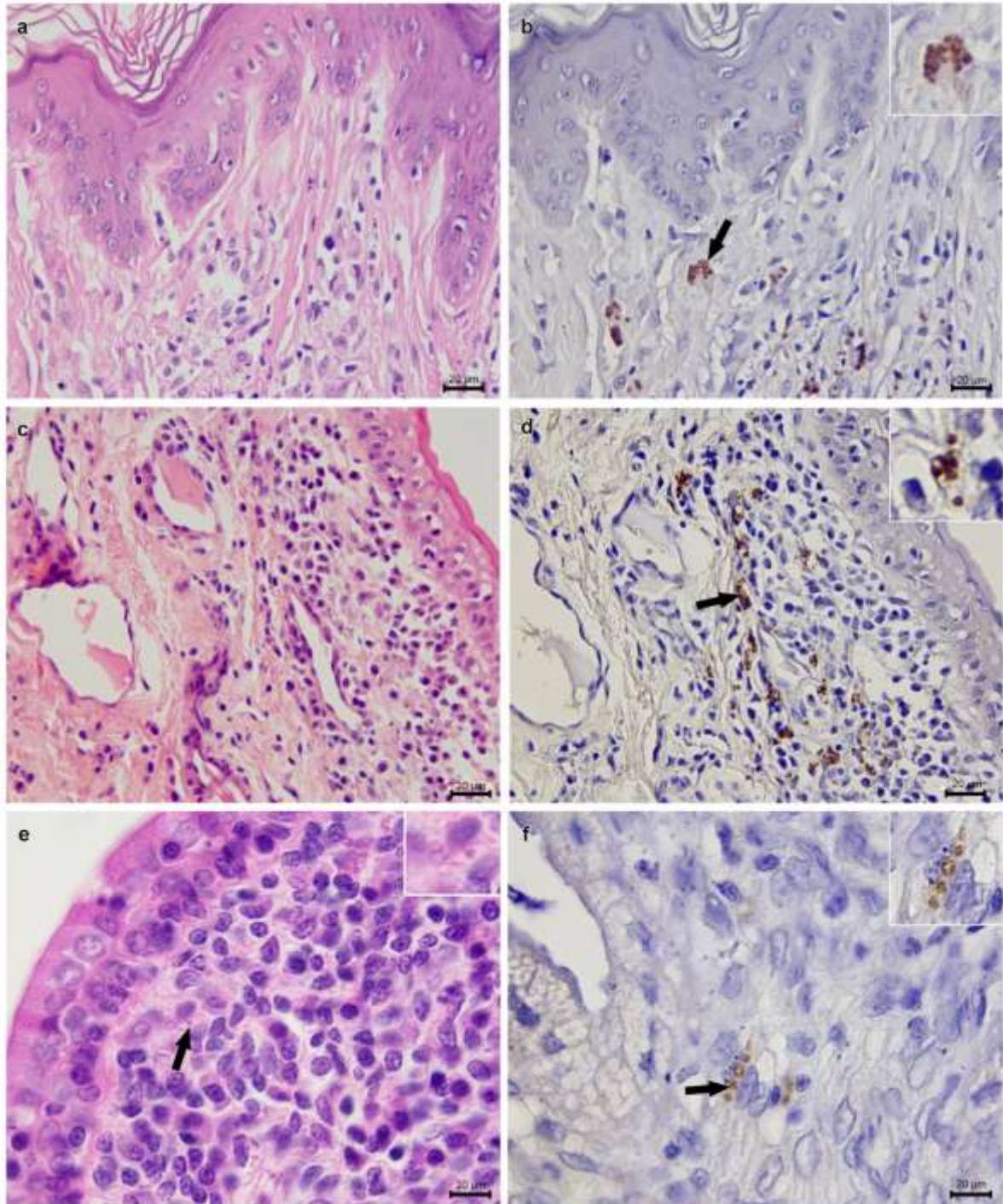
No trato genital dos 47 cães positivos para *Leishmania* nos exames parasitológicos, alterações histológicas foram observadas em pelo menos um dos tecidos examinados em todos os machos (Fig. 3A-F) e fêmeas (Fig 4A-F). Dos 23 cães negativos nos exames parasitológicos, 9 fêmeas e 10 machos apresentaram alterações histológicas em pelo menos um dos tecidos examinados.

Figura 3- Achados histopatológicos no trato genital masculino de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, agosto de 2015 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil)



**a-** Orquite intersticial granulomatosa difusa e acentuada; **b-** Muitas amastigotas de *Leishmania* marcadas em castanho no citoplasma de macrófagos no tecido intersticial do testículo; **c-** Epididimite intersticial granulomatosa difusa e acentuada; **d-** Formas amastigotas de *Leishmania* marcadas em castanho no citoplasma de macrófagos (setas e detalhe) no epidídimo; **e-** Próstata apresentando inflamação granulomatosa difusa e acentuada, fibrose e atrofia glandular; **f-** Formas amastigotas de *Leishmania* marcadas em castanho no citoplasma de macrófago (seta e detalhe) na próstata. **a,c,e-** Coloração hematoxilina-eosina; **b,d,f-** Imuno-histoquímica.

Figura 4- Achados histopatológicos no trato genital feminino de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, agosto de 2015 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil)



**a-** Vulvite granulomatosa moderada e difusa na derme e acantose e hiperqueratose da epiderme; **b-** Formas amastigotas de *Leishmania* marcadas em castanho no citoplasma de macrófagos (seta e detalhe) na vulva; **c-** Vaginite granulomatosa acentuada e difusa na lâmina própria; **d-** Diversas amastigotas de *Leishmania* marcadas em castanho no citoplasma de macrófagos (seta e detalhe) na vagina; **e-** Endometrite granulomatosa acentuada e difusa na lâmina própria com formas amastigotas de *Leishmania* (seta e detalhe) no citoplasma de macrófago; **f-** Formas amastigotas de *Leishmania* marcadas em castanho no citoplasma de macrófagos (seta e detalhe) no útero. **a,c,e-** Coloração hematoxilina-eosina; **b,d,f-** Imuno-histoquímica.

As frequências de alterações histopatológicas no trato genital de cães com e sem positividade para *Leishmania* pelos testes parasitológicos (cultura, HP ou IHQ) nesses tecidos estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3- Alterações histológicas em cada tecido do trato genital de cães naturalmente infectados por *L. infantum* de acordo com resultados de exames parasitológicos, agosto de 2015 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil)

Amostras	Alterações histológicas	Exame parasitológico para <i>Leishmania</i> <sup>a</sup>			
		Positivo <sup>b</sup>		Negativo	
		n/total	%	n/total	%
Testículo (N=45)	Inflamação granulomatosa	21/26	80,7	5/19	26,3
	Degeneração de túbulos seminíferos	18/26	69,2	3/19	15,7
	Atrofia de túbulos seminíferos	14/26	53,8	4/19	21,0
	Ausência de espermatogênese	10/26	38,4	0/19	0,0
	Fibrose	4/26	15,3	1/19	5,2
	Inflamação não granulomatosa	2/26	7,69	0/19	0,0
	Necrose	1/26	3,8	0/19	0,0
Epidídimo (N=45)	Inflamação granulomatosa	21/23	91,3	11/22	50,0
	Inflamação não granulomatosa	2/23	8,6	2/22	9,0
Próstata (N=45)	Inflamação não granulomatosa	8/12	66,6	10/33	30,3
	Fibrose e atrofia glandular	6/12	50,0	2/33	6,0
	Inflamação granulomatosa	1/12	8,3	1/33	3,0
Vulva (N=25)	Inflamação granulomatosa	9/14	64,2	7/11	63,6
	Inflamação não granulomatosa	5/14	35,7	1/11	9,0
	Hiperqueratose	2/14	14,2	0/11	0,0
Vagina (N=25)	Inflamação granulomatosa	4/16	25,0	1/9	11,1
	Inflamação não granulomatosa	4/16	25,0	0/9	0,0
Útero (N=25)	Inflamação granulomatosa	3/8	37,5	0/17	0,0
	Inflamação não granulomatosa	1/8	12,5	0/17	0,0

<sup>a</sup>Exame parasitológico: técnicas de histopatologia, imuno-histoquímica e cultura parasitológica; <sup>b</sup> Positividade em pelo menos 1 técnica; N= número de amostras de cada tecido do trato genital que foram examinadas; n= número de amostras do trato genital com alterações histológicas; %=porcentagem.

A intensidade do infiltrado inflamatório de acordo com carga de *L. infantum* nos órgãos do trato genital dos cães estudados é descrita na Tabela 4.

Tabela 4- Intensidade inflamatória de acordo com a carga de *L. infantum* em amostras do trato genital de cães naturalmente infectados, agosto de 2015 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil)

Sexo	Amostras	Intensidade inflamatória						p-valor
		Ausente ou Leve			Moderada a Intensa			
		n	Med	Min–Max	n	Med	Min–Max	
Macho (N=45)	Testículo	24	6,98	-2,04 – 13,93	21	10,86	-0,98 – 18,81	0,0174
	Epidídimo	16	3,13	-1,15 – 12,80	29	10,33	3,91 – 15,34	<0,001
	Próstata	33	3,00	0,0 – 13,27	12	4,00	0,0 – 8,76	0,857
Fêmea (N=25)	Vulva	7	10,28	4,72 – 18,39	18	8,82	0,50 – 15,81	0,275
	Vagina	20	7,44	1,09 – 15,92	5	7,30	2,59 – 16,48	0,938
	Útero	23	4,17	0,69 – 14,17	2	9,75	5,69 – 13,81	0,186

N=número de cães, n= número de amostras de cada tecido do trato genital; Med=mediana da carga parasitária de *L. infantum* expressa em logaritmo natural do equivalente genômico/nanograma de DNA (gEq)/ng.

### 5.5 Avaliação da frequência de *Brucella* spp.

Anticorpos anti-*B. canis* foram detectados pela técnica de IDGA em três cães (4,3%), sendo dois machos e uma fêmea (Tabela 5). Todos os cães foram negativos para anticorpos anti-*B. abortus* pela técnica de soroaglutinação pelo antígeno acidificado tamponado. No animal 2, a próstata apresentou carga parasitária de *L. infantum* superior em relação às outras amostras de próstata de cães monoinfectados por *L. infantum*, que apresentaram carga variando de 1,1 a 8,7(gEq)/ng.

Não houve detecção de DNA de *Brucella* spp. pela técnica de qPCR.



Tabela 5- Descrição de sexo, raça, idade, sinais clínicos, alterações histológicas, positividade para *Leishmania* no trato genital e carga parasitária de *L. infantum* em três cães com anticorpos anti-*B. canis* detetados pela técnica de IDGA, agosto de 2015 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil)

Cão	Sexo	Raça	Idade (anos)	Sinais clínicos	Alterações histológicas	<i>Leishmania</i> no TG (CP+IHQ+HP+ qPCR)	Carga de <i>L. infantum</i> <sup>a</sup>
1	M	S.R.D.	4	Magreza, alopecia, descamação, úlceras crostosas, linfadenomegalia, esplenomegalia, onicogribose	Orquite granulomatosa, moderada a intensa, intersticial, bilateral com atrofia e degeneração dos túbulos seminíferos;  Epididimite granulomatosa, moderada a intensa, bilateral	T (+) E (+) P (-)	T=6,87 E=6,30
2	M	S.R.D.	3	Magreza, alopecia, descamação, úlceras crostosas, linfadenomegalia, esplenomegalia, onicogribose	Orquite granulomatosa moderada a intensa intersticial, bilateral, com atrofia e degeneração dos túbulos seminíferos;  Epididimite granulomatosa moderada a intensa unilateral;  Prostatite linfoplasmocitária discreta com fibrose e atrofia das glândulas	T (+) E (+) P (+)	T=13,93 E=10,53 P=13,27
3	F	S.R.D.	2	Magreza, alopecia, descamação, úlceras crostosas, linfadenomegalia, esplenomegalia	Dermatite vulvar granulomatosa moderada a intensa e acantose;  Vaginite discreta na lâmina própria e perivascular (raros macrófagos e neutrófilos);  Hiperplasia endometrial	Vu (+) Va (+) U (+)	Vu=4,73 Va=10,73 U=12,34

M: Macho; F: Fêmea; S.R.D.: Sem raça definida; TG: Trato genital; CP: Cultura Parasitológica; IHQ: Imuno-histoquímica; HP: Histopatologia; qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa; T: testículo; E: epidídimo; P: próstata; Vu: vulva; Va: vagina; U: útero; (+): positivo para *Leishmania*; (-): negativo para *Leishmania*; <sup>a</sup> carga parasitária de *L. infantum* expressa como logaritmo natural do número de equivalentes genômicos (gEq)/ng

## 6 DISCUSSÃO

Os achados do presente estudo sugerem que o parasitismo de *L. infantum* nos órgãos do trato genital dos cães não é influenciado pelo sexo, uma vez que tanto em machos como em fêmeas foi observada elevada frequência do parasito nesses órgãos. Em relatos anteriores, que incluíram cães com confirmação parasitológica para *L. infantum*, foi detectada frequência de positividade no trato genital de 94,7% (n=18/19) em machos e 90% (n=9/10) em fêmeas, utilizando IHQ e qPCR. Ao contrário do presente estudo, esses relatos incluíram número inferior de cães além de machos e fêmeas pertencerem à regiões endêmicas distintas, o que pode dificultar uma comparação de ocorrência entre sexos numa mesma região e a hipótese de transmissão bidirecional nesses casos (OLIVEIRA et al., 2016a;b). Em outro relato, cães com confirmação parasitológica e pertencentes à mesma área do nosso estudo apresentaram frequência de positividade no trato genital de 90% (n=18/20) em machos e 80% (n=16/20) em fêmeas (BOECHAT et al., 2016). Essa frequência mais baixa pode ser devido a utilização exclusiva de exames parasitológicos, sem qPCR que é mais sensível. Entretanto, outros trabalhos com fêmeas soropositivas sugerem que *L. infantum* não tem tropismo pelo trato genital feminino, uma vez que a frequência de formas amastigotas desse parasito e de alterações inflamatórias associadas foi baixa nos órgãos genitais (SILVA et al., 2009; 2008). Esses diferentes resultados podem ter ocorrido devido ao número pequeno de fêmeas estudadas (n=10 e 12), além da utilização exclusiva da sorologia positiva na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) como critério de inclusão dos cães. De acordo com Coura-Vital et al. (2011), a RIFI possui acurácia inferior a técnica de DPP e ELISA combinadas, que foram utilizadas no presente estudo como critério de inclusão. Portanto, cães falsamente positivos para *Leishmania* podem ter sido incluídos por esses autores.

Nossos resultados indicam que dos órgãos estudados, a frequência de positividade foi maior no epidídimo, seguido da vagina e vulva, testículos, útero e próstata, considerando todas as técnicas de diagnóstico. Houve uma variação pequena de 6 a 14% entre epidídimo, vagina, vulva e útero. A próstata apresentou frequência de positividade baixa discrepante dos outros órgãos, com diferenças variando de 18% a 32%. Outros autores encontraram no trato genital masculino frequências semelhantes entre testículo e epidídimo com 89,5% (n=17/19) e 84,2% (n=16/19), respectivamente (OLIVEIRA et al.,2016a). Na próstata, esses mesmos autores (OLIVEIRA et al.,2016a) encontraram frequência mais baixa do que nos testículos e epidídimo, de 78,9% (15/19), porém mais alta do que a observada em nosso estudo, que

incluiu mais que o dobro de cães. Em fêmeas já foi relatada frequência de positividade semelhante entre os órgãos do trato genital, sendo maior no útero com 80% (n=8/10), seguido da vagina com 70% (n=7/10) e vulva com 60% (n=6/10), diferente do presente estudo, no qual frequências bem superiores de parasitismo na vulva e vagina foram observadas (OLIVEIRA et al., 2016b).

No presente estudo, ao considerar apenas os resultados dos exames parasitológicos, os percentuais de positividade do trato genital masculino e feminino permaneceram altos e semelhantes, apesar da positividade ter sido ligeiramente maior no trato genital masculino. Adicionalmente, testículos, epidídimo, vulva e vagina permaneceram os mais positivos com percentual de positividade alto, acima de 50% e o útero e próstata com percentuais de positividade mais inferiores, abaixo de 33%. Entretanto, esses percentuais de positividade são bem inferiores à técnica de qPCR, o que era esperado por ser uma técnica mais sensível para detecção de *L. infantum* em tecidos de cães (OLIVEIRA et al., 2017; PALTRINIERI et al., 2010). Em outros trabalhos, utilizando somente técnicas parasitológicas, no trato genital masculino foi encontrada frequência de positividade maior no epidídimo, variando de 55% a 77,5%, seguido do testículo com 45% a 55% e próstata com 15% a 55% (DINIZ et al., 2005; BOECHAT et al., 2016). E no trato genital feminino, já foi relatada frequência de positividade maior na vulva com 70%, seguida da vagina com 45% e útero com 15% em amostra de 20 cadelas (BOECHAT et al., 2016). Dessa forma, de acordo com os relatos e nossos resultados, testículos e epidídimos são normalmente os mais parasitados nos machos e vulva e vagina nas fêmeas, sendo o útero e próstata os menos parasitados. Apesar disso, os resultados do útero indicam que cerca de 1/3 das cadelas tinham parasitos viáveis, podendo ocorrer transmissão vertical já comprovada anteriormente (ROSYPAL et al., 2005a; DA SILVA et al., 2009; PANGRAZIO et al., 2009; BEN SLIMANE et al., 2014).

Com relação às cargas parasitárias, os quatro tecidos com maior carga foram testículo, seguido da vulva, epidídimo e vagina, sendo os mesmos tecidos com maiores frequências de positividade, porém sem diferença significativa entre eles. Próstata, seguida do útero foram os tecidos com carga mais baixa, corroborando com o fato de serem os com menos frequência de positividade. Outros autores também detectaram carga superior por qPCR em testículo e epidídimo, apesar de não observarem diferença estatística significativa com a carga da próstata (OLIVEIRA et al., 2016a). E em fêmeas, diferente do nosso estudo, foi relatado que vulva, vagina e útero apresentaram carga por qPCR muito semelhante, não havendo diferença estatística significativa entre esses tecidos (OLIVEIRA et al., 2016b). Outros relatos que

avaliaram carga parasitária por IHQ também detectaram carga maior nos machos em testículo e epidídimo e nas fêmeas em vulva e vagina (DINIZ et al., 2005; BOECHAT et al., 2016).

No geral, as frequências de positividade e medianas das cargas parasitárias do testículo, epidídimo, vulva e vagina foram semelhantes. Esses resultados sugerem que não somente os machos (DINIZ et al., 2005), mas também as fêmeas podem desempenhar um papel importante na transmissão venérea de LVC e que essa transmissão ocorra de forma bidirecional, como já sugerido em outras pesquisas (BOECHAT et al., 2016; MAGRO et al., 2017). A correlação das cargas observadas entre testículo e epidídimo e entre vulva e vagina foi considerada positiva, demonstrando que quanto maior é a carga de *L. infantum* em um órgão, maior a carga desse parasito no outro órgão. Essa correlação positiva pode ser explicada pela proximidade anatômica e comunicação desses órgãos (FELDMAN; NELSON, 1987; JUBB et al., 1993). Infecção ascendente por via venérea é uma rota possível, principalmente quando a genitália externa é mais parasitada, como já foi verificado anteriormente, além de isolamento de *L. infantum* tanto no sêmen, líquido seminal, quanto em secreções vaginais (RIERA; VALLADARES, 1996; BOECHAT et al., 2016; MAGRO et al., 2017). Além disso, como a genitália externa fica exposta a possíveis picadas de flebotômios infectados, posterior disseminação do parasito pode ocorrer e influenciar no elevado parasitismo desses órgãos, uma vez que também já foi relatado elevadas frequências de positividade na vulva e prepúcio, porém baixa na pele do escroto (DINIZ et al., 2005; BOECHAT et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016a; CARVALHO JUNIOR et al., 2017). Portanto, a clássica transmissão vetorial, levando a infecção por via hematogênica ou linfática é uma das hipóteses de infecção nesses cães.

No presente estudo, detecção de maior carga parasitária na vagina das fêmeas com muitos sinais clínicos, comparadas com fêmeas sem ou com poucos sinais clínicos, sugere uma maior probabilidade de transmissão venérea nessas fêmeas. Apesar da mesma associação não ter ocorrido nos outros tecidos, todos, exceto a próstata, apresentaram carga ligeiramente superior nos cães com mais sinais clínicos de LVC. Há relato de carga de *L. infantum* detectada por IHQ, significativamente maior em testículo, epidídimo, glândula e prepúcio de cães com sinais clínicos de LVC do que em cães sem sinais e há relato de carga significativamente maior apenas em epidídimo e prepúcio, sugerindo que haja um maior potencial de transmissão venérea em cães com sinais clínicos compatíveis com a LVC (CARVALHO JUNIOR et al., 2017). Até o momento, nas fêmeas tal associação não foi relatada no trato genital.

Uma hipótese já relatada anteriormente para a transmissão venérea de LVC dos machos para as fêmeas pode ser devido as frequentes feridas traumáticas na genitália externa resultantes da cópula dos cães (FOSTER, 2013), possibilitando a transferência de formas amastigotas de *Leishmania* (DINIZ et al., 2005; SILVA et al., 2009). Em estudo anterior, foi verificada presença de formas amastigotas no epitélio uretral e isolamento de *L. infantum* no líquido seminal de machos, reforçando a possibilidade de transmissão venérea através do sêmen (BOECHAT et al., 2016). Apesar de não ter avaliado o sêmen, o presente estudo também contribui para tal afirmação, já que identificou alta viabilidade de *L. infantum* no trato genital masculino, principalmente nos testículos, onde parte do sêmen é produzido, e epidídimo, onde em casos de inflamação, com frequência se associa à presença de células inflamatórias no sêmen, possibilitando eliminação do parasito em caso de LVC (NELSON; COUTO, 1994).

Os resultados da próstata sugerem que seja um local de baixo tropismo do parasito, já que apesar da frequência de positividade ser pouco mais de 50%, a carga parasitária é significativamente inferior a todos os outros tecidos analisados. Além disso, outros autores ao avaliarem o perfil leucocitário nesse tecido, não observaram maior transmigração epitelial de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (BENITES et al., 2011). Por sua vez, a transmissão venérea das fêmeas para os machos já foi sugerida pela ocorrência do comportamento sexual natural do macho de cheirar e lambar a vulva, entrando em contato com secreções vaginais positivas para DNA de *L. infantum*, além do próprio contato do pênis com essas secreções no momento da cópula (MAGRO et al., 2017).

Infiltrado inflamatório foi observado na maioria dos cães em pelo menos um dos tecidos do trato genital examinados, tendo predominado o infiltrado granulomatoso, com exceção da próstata. A frequência do infiltrado e demais alterações histológicas foi muito superior nos tecidos nos quais houve detecção do parasito, comparado aqueles nos quais apenas DNA ou nenhum parasito foi detectado. Esses resultados indicam que essas alterações estiveram associadas à infecção ativa por *L. infantum*.

A explicação para a próstata ter apresentado predomínio de reação inflamatória não granulomatosa, como em outras pesquisas em cães com LVC (MIR et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016a), pode ser o fato dela ter apresentado a menor carga parasitária e frequência de positividade para *L. infantum* que os outros órgãos examinados. Adicionalmente, outras causas de prostatite não granulomatosa podem ter influenciado no predomínio desse tipo de reação inflamatória como infecções bacterianas com *Escherichia coli* ou refluxo de urina (BARSANTI, 2012). Nos testículos, a inflamação associada à infecção por *L. infantum* foi a

provável causa da degeneração e atrofia dos túbulos seminíferos, fibrose, necrose e ausência de espermatogênese, corroborando outras pesquisas (DINIZ et al., 2005; AMARA et al., 2009; BOECHAT et al., 2016). Essas alterações, juntamente com a prostatite acompanhada de fibrose e atrofia glandular observadas nesse estudo, podem prejudicar a qualidade do espermatozoide e levar a infertilidade dos cães com LVC (MIR et al., 2012).

Com exceção da vulva e vagina, nos órgãos do trato genital com inflamação moderada a intensa, a carga parasitária foi maior do que nos que apresentaram inflamação ausente a leve, embora associação significativa tenha sido observada apenas no testículo e epidídimo. Na vulva e vagina, o resultado pode ter sido influenciado por poucos animais nos grupos com reação ausente a leve na vulva e moderada a intensa no caso da vagina. Esses resultados sugerem que intensidade da inflamação está relacionada com a carga parasitária, concordando com outros autores (DINIZ et al., 2005; CARVALHO JUNIOR et al., 2017).

Em relação às técnicas de diagnóstico utilizadas, a maior frequência de positividade para *L. infantum* foi detectada por qPCR seguida da cultura parasitológica e técnicas histológicas. A técnica de qPCR tendo como alvo múltiplas sequências de DNA como o gene do minicírculo do cinetoplasto de DNA, a torna altamente sensível (SILVA et al., 2016). Estudos têm descrito alta sensibilidade na detecção de pequenas cargas de parasitas, utilizando qPCR (FRANCINO et al., 2006; MANNA et al., 2009; SOLCÀ et al., 2014). Por ser uma técnica quantitativa, também é utilizada para monitorar a carga parasitária em tecidos de cães (MAIA; CAMPINO, 2008; MARTINEZ et al., 2011; GALLETI et al., 2011).

A cultura parasitológica seguida da utilização da técnica de eletroforese enzimática multilocus constitui o método de referência para caracterização de protozoários do gênero *Leishmania*. Devido sua especificidade de aproximadamente 100% (GONTIJO; MELO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b) e relativa sensibilidade é uma das técnicas mais tradicionais no contexto diagnóstico das leishmanioses. Porém, os resultados são demorados, além de ser suscetível a contaminação microbiológica e poder ser de difícil realização devido a pobre adaptação de algumas espécies ao meio de cultura (MAIA et al., 2008).

As técnicas histológicas, apesar de serem apenas gênero específicas e apresentarem baixa sensibilidade, são fundamentais para a visualização das formas amastigotas, permitindo a correlação dos parasitos com as lesões associadas (QUEIROZ et al., 2011). Nossos resultados indicam que a associação da qPCR às técnicas parasitológicas, aumentou a sensibilidade diagnóstica da infecção por *L. infantum*, porém em quatro casos a positividade foi exclusiva nas técnicas parasitológicas, confirmando a necessidade de unir diferentes técnicas para um diagnóstico mais fidedigno.

Uma vez estabelecida a infecção por *L. infantum*, os parasitos podem deixar a pele e se disseminarem para outros órgãos, gerando um processo inflamatório que o sistema imune tenta debelar. Porém, a manifestação da doença é caracterizada por uma resposta imune celular ineficiente contra o parasito e ainda, com imunossupressão, podendo ocorrer o agravamento do quadro clínico ou enfraquecimento da defesa contra novos patógenos, proporcionando o aparecimento das coinfeções (REIS et al., 2006). As coinfeções de outros agentes bacterianos e parasitários com *L. infantum* são conhecidas e descritas, podendo gerar progressão e aumento da mortalidade por LVC (MEKUZAS et al., 2009, OLIVEIRA et al., 2017; TOEPP et al., 2019).

A ocorrência de anticorpos anti-*B. canis* no presente estudo foi baixa, semelhante à maioria dos estudos realizados em cães no estado do Rio de Janeiro, que varia entre 2,5% a 9,2% e de 0,8% a 14,2% em outros municípios do Brasil situados nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraíba, Bahia, Rondônia, Alagoas e Rio Grande do Sul (Tabela1). Poucos estudos encontraram prevalências superiores a 20%, como as relatadas no município de Araguaína no estado de Tocantins, com 44,6%, seguido por soroprevalência de 28,9% no município de Natal, estado do Rio Grande do Norte, e de 25,7% nos municípios de Niterói e Rio de Janeiro do estado do Rio de Janeiro (Tabela 1). Dessa forma, fica evidente que apesar da circulação da bactéria no Brasil, os levantamentos sorológicos sobre a prevalência da brucelose canina são variáveis e dependem da área geográfica e do tipo de teste aplicado. No exterior, as soroprevalências encontradas também são baixas, variando de 0,8% a 15%, nos países Canadá, Argentina e Colômbia, demonstrando que a situação de outros países não é muito distinta do que ocorre no Brasil (BOSU; PRESCOTT, 1980; LOPEZ et al., 2009; CASTRILLON-SALAZAR et al., 2013).

A ausência de DNA de *Brucella* spp. pela técnica de PCR no trato genital desses cães, que é um método mais sensível e específico que a IDGA, pode ser devido a resolução da infecção, havendo a persistência de anticorpos no sangue, ou infecção ativa em outro órgão diferente dos examinados. Apesar dos órgãos do trato genital examinados ser um dos mais comumente infectados na brucelose canina, outros órgãos não examinados como baço, linfonodos e disco intervertebral são sítios comuns de infecção por *B. canis* em cães (CARMICHAEL;GREENE, 2012). Outros autores ao compararem testes sorológicos com cultura de sangue e PCR de amostras de sangue e do trato genital (swab vaginal e sêmen), encontraram sensibilidade significativamente maior para técnica de PCR comparada a técnica de IDGA (com antígenos de membrana de *B. ovis*). Porém, não houve diferença significativa entre sorologia e cultura, sendo os resultados positivos da IDGA, associados à presença de

bacteremia (KEID et al., 2009). No estudo citado, o teste de IDGA apesar de ter baixa sensibilidade (52,9%) apresentou 100% de especificidade.

Outra hipótese é que os resultados do teste de IDGA empregado no presente trabalho sejam falso-positivos, já que utiliza antígenos de membrana, apresentando a possibilidade de reação cruzada com outras bactérias (MINHARRO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011). Há outro teste de IDGA, empregando antígenos intracitoplasmáticos da *B. canis*, que é um método muito específico. Entretanto, esse teste pode apresentar baixa sensibilidade com uma proporção significativa de resultados falso negativos, principalmente em infecções recentes, e não está disponível comercialmente no Brasil (MINHARRO et al., 2005; KEID et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Porém, mesmo com as limitações, o IDGA com antígenos de membrana é um teste sorológico aceito internacionalmente e disponível no Brasil para diagnóstico sorológico da brucelose canina. É um teste útil, uma vez que a cultura, teste padrão-ouro, necessita de laboratórios de nível 3 de biossegurança se, tornando muitas vezes inviável o diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006a).

A inflamação granulomatosa observada no trato genital é compatível com infecções por *L. infantum* e *B. canis* (MAKLOSKY, 2011; RODRIGUES et al., 2016; BOECHAT et al., 2016). Porém, a negatividade na qPCR para *Brucella* e a detecção de *L. infantum* no trato genital de seis dos sete cães soropositivos para *Brucella* spp., sugerem que a inflamação granulomatosa esteve associada à infecção por *L. infantum*. Adicionalmente, parece não ter havido influência da soropositividade para *Brucella* spp. com relação à frequência e tipos de sinais clínicos e carga de *L. infantum*, uma vez que esses resultados foram semelhantes aos dos cães sem anticorpos anti-*B. canis*. Entretanto, a participação da *Brucella* não deve ser excluída totalmente, uma vez que a carga parasitária da próstata de um dos cães soropositivos para *Brucella* spp. foi maior do que a encontrada na próstata dos cães infectados somente por *L. infantum*. Nesse cão, a prostatite linfoplasmocitária acompanhada de fibrose e atrofia das glândulas compõe um espectro de alterações histológicas muito incriminadas na infecção por *B. canis* (RODRIGUES et al., 2016). Dessa forma, há a possibilidade de que pelo menos nesse cão soropositivo para *B. canis* a carga de *L. infantum* pode ter sido influenciada pela coinfeção com essa bactéria, ressaltando a importância de se considerar a brucelose canina no diagnóstico diferencial da LVC no trato genital.

A baixa ocorrência de anticorpos anti-*B. canis* e a não detecção de DNA dessa bactéria na população canina estudada, sugerem que a infecção por *L. infantum* parece não aumentar a susceptibilidade à infecção por *B. canis*. Entretanto, a soropositividade para *B. canis*



demonstra exposição de cães a essa bactéria em área endêmica de leishmaniose visceral e alerta para inclusão da brucelose canina no diagnóstico diferencial da LVC.

A alta frequência, presença de infecção ativa e cargas similares de *L. infantum* nos testículos, epidídimo, vulva e vagina de cães naturalmente infectados sugerem que tanto os machos como as fêmeas são capazes de transmitir esse parasito por via venérea. Juntamente com a transmissão venérea, a transmissão vertical na população canina da área estudada pode ser frequente, uma vez que formas viáveis de *L. infantum* foram observadas comumente no útero. Portanto, a castração de cães pode ser uma medida importante para o controle da LVC em áreas endêmicas.

## 7 CONCLUSÕES

- A frequência e viabilidade de *L. infantum* no trato genital de machos e fêmeas soropositivos para esse parasito foi elevada em Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro;
- A frequência de anticorpos anti-*B. canis* foi baixa em cães soropositivos para *L. infantum* na área estudada;
- A carga de *L. infantum* foi similar em testículos, epidídimo, vulva e vagina e acompanhada de alterações inflamatórias nesses órgãos;
- A intensidade dos sinais clínicos não foi associada com a carga de *L. infantum* no trato genital, exceto na vagina;
- A carga parasitária de *L. infantum* esteve associada à intensidade inflamatória no testículo e epidídimo;
- A técnica de qPCR foi o método mais efetivo para a detecção de *L. infantum* no trato genital;
- Dos métodos parasitológicos, a cultura foi a melhor técnica que detectou o maior número de tecidos positivos, exceto no epidídimo;
- A maioria das alterações histológicas esteve associada à infecção ativa por *L. infantum*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; VASCONCELLOS, S.A. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella abortus* e anti-*Brucella canis* em cães rurais e urbanos do Município de Monte Negro, Rondônia, Brasil. **Cienc. Rural.** v.35, n.5, p.1216-1219, 2005.
- ALMEIDA, M.A.; JESUS, E.E.; SOUSA-ATTA, M.L. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet. Parasitol.** v.127, n.3-4, p. 227-32, 2005.
- ALMEIDA, A.C.; SANTORELLI, A.; BRUZADELLI, R.M.Z. et al. Soroepidemiologia da brucelose canina causada por *Brucella canis* e *Brucella abortus* na cidade de alfenas, MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**v.56, n.2, p.275-6, 2004.
- ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRES, M. et al. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** v.88, p.371–378, 1994.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One.** v.7, n.5, e35671, 2012.
- ALVES, F.A.L.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S. et. al. Prevalência de anticorpos anti-*Brucella canis* em cães na cidade de Patos-PB. In: Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária, 4., 1999, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária; 1999. p. 259-60.
- AMARA, A.; MRAD, I.; MELKI, M.K. et al. Etude histologique des lésions testiculaires chez les chiens leishmaniens. **Revue Méd. Vét.** v.160, n.1, p. 54-60, 2009.
- ANDERSON, G.I.; BINNINGTON, A.G. Discospondylitis and orchitis associated with high *Brucella* titre in a dog. **Can. Vet. J.** v. 24, n.8, p. 249–52, 1983.
- ARAS, Z.; TAŞPINAR, M.; AYDIN İ. A Novel Polymerase Chain Reaction to Detect *Brucella canis* in Dogs. **Kafkas. Univ. Vet. Fak. Derg.** v.21, n.2, p. 169-72, 2014.
- ARAS, Z.; UÇAN, US. Detection of *Brucella canis* from inguinal lymph nodes of naturally infected dogs by PCR. **Theriogenology.**v.74, n.4, p.658-62, 2010.
- AZEVEDO, S.S.; VASCONCELLOS, S.A.; KEID, L.B. et al. Comparação de três testes sorológicos aplicados ao diagnóstico da infecção de caninos por *Brucella canis*. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**v. 41, n.2, p.106-12, 2004.
- AZEVEDO, S.S.; VASCONCELLOS, S.A.; ALVES, C.J. et al. Inquérito sorológico e fatores de risco para a brucelose por *Brucella canis* em cães do município de Santana do Parnaíba, Estado de São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.** v.23, n.4,p.156-60, 2003.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis. In: Greene, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 4th ed. St Louis, MO: Elsevier/Saunders, 2012. p. 734–49.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol.** v.24, n.7, p.324-30, 2008.

BAÑULS, A.L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv Parasitol.** v. 64, p.1-109, 2007.

BARATA, R.A.; PEIXOTO, J.C.; TANURE, A.; GOMES, M.E.; APOLINÁRIO, E.C.; BODEVAN, E.C. et al. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in a Reemerging Focus of Intense Transmission in Minas Gerais State, Brazil. **BioMed. Res. Int.** v.2013, n.2013, p.1-6, 2013.

BARSANTI, J.A. Genitourinary Infections. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 4th ed. St Louis, MO: Elsevier/Saunders, 2012. p. 1031-32.

BENITES, A.P.; FERNANDES, C.E.; BRUM, K.B. et al. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. **Pesq. Vet. Bras.** v.31, n.1, p. 72-7, 2011.

BEN SLIMANE, T.; CHOUIHI, E.; BEN HADJ AHMED, S. et al. An investigation on vertical transmission of *Leishmania infantum* in experimentally infected dogs and assessment of offspring's infectiousness potential by xenodiagnosis. **Vet.Parasitol.** v. 206, n.3-4, p. 282-6, 2014.

BİLMAN, F. B.; GÜRBİLEK, S. E.; TURHANOĞLU, M. Evaluation of the epidemiological situation *B.canis* infections in human and *B.canis* seroprevalence in Diyarbakir, Turkey. **Sci. J. Public Health.** v.2, n.2, p. 87-91, 2014.

BOECHAT, V.C.; MENDES JUNIOR, A.A.V.; MADEIRA, M.F. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. **Parasitol. Res.** v.115, n.6, p.2371-9, 2016.

BORASCHI, C.S.S.; NUNES, C.M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clin. Vet.** v.71, n.1, p. 44-8, 2007.

BOSU, W.T.K.; PRESCOTT, J.F. A serological survey of dogs for *Brucella canis* in southwestern Ontario. **Can. Vet. J.** n.21, p.198–200, 1980.

BRENNAN, S.J.; NGELEKA, M.; PHILIBERT, H.M.et.al. Canine brucellosis in a Saskatchewan kennel. **Can. Vet. J.** v.49, n.7,p.703-8, 2008.

BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Vet. Microbiol.** v.90, p.435–46, 2002.

- CABRERA, M.A.A.; PAULA, A.A.; CAMACHO, L.A.B. et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. **Rev. Inst. Med. trop. S Paulo**. v.45, n.2, p. 79-83, 2003.
- CARDIM, M.F.M.; RODAS, L.A.C.; DIBO, M.R. et al. Introdução e expansão da Leishmaniose visceral americana em humanos no estado de São Paulo, 1999-2011. **Rev. Saúde Pública**. v.47, n.4, p.691-700, 2013.
- CARMICHAEL, L.E. & GREENE, C.E. Canine Brucellosis. In: GREENE, C.E. **Infections disease of the dog and cat**. 4<sup>a</sup> ed. Philadelphia : W.B. Company, 2012. p.398-411.
- CARMICHAEL, L.E.; JOUBERT, J.C.; JONES, L. Characterization of *Brucella canis* protein antigens and polypeptide antibody responses of infected dogs. **Vet. Microbiol**. v.19, p.373-87, 1989.
- CARMICHAEL, L.E. Abortions in 200 beagles. **J. Am. Vet. Med. Assoc**. v.149,p.1126, 1966.
- CARSON, F.L.; HLADICK, C. Histotechnology: a self instructional text, 3 rd ed. ASCP Press Chicago, IL. 2015.
- CARVALHO JUNIOR, C.G.; TEIXEIRA NETO, R.G.; LOPES, V.V. et al. Parasitism and inflammation in ear skin and in genital tissues of symptomatic and asymptomatic male dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitol. Res**.v.116, p.987-995, 2017.
- CASTRILLON-SALAZAR, L.; GIRALDO-ECHEVERRI, C.A.; SANCHEZ-JIMENEZ, M.M. et al. Factores asociados con la seropositividad a *Brucella canis* en criaderos caninos de dos regiones de Antioquia, Colombia. **Cad. Saúde Pública**. v.29, n.10, p.1955-1973, 2013.
- CASTRO-JÚNIOR, J.G.; FREIRE, M.L.; CAMPOS, S.P.S. et al. Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais state, Brazil, based on immunochromatographic dual-path latform (DPP®) and PCR assays. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**. v.56, n.3, p.225-29, 2014.
- CAVALCANTI, L.A.; DASSO, M.G.; OLIVEIRA, F.C.S. et al. Pesquisa de anticorpos anti-*brucella canis* em cães provenientes da região metropolitana de Salvador. **Rev. Bras. Saúde Prod. An**. v.7, n.2, p.176-80, 2006.
- CHINYOKA, S.; DHLIWAYO, S.; MARABINI L. et al. Serological survey of *Brucella canis* in dogs in urban Harare and selected rural communities in Zimbabwe. **J. S. Afr. Vet. Assoc**. v.85, n.1, p.1087, 2014.
- CIROVIĆ, D.; CHOCHLAKIS, D.; TOMANOVIĆ, S. et al. Psaroulaki A. Presence of *Leishmania* and *Brucella* species in the golden jackal *Canis aureus* in Serbia. **Biomed. Res. Int**. v. 2014, n.728516, 2014.
- CORBEL, M.J. **Brucellosis in Humans and Animals**. World Health Organization. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Organization for Animal Health. WHO:Geneva. 2006. 102p. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf> > Acesso em 15 abr 2015.

CORRENTE, M.; FRANCHINI, D.; DECARO, N.; GRECO, G.; D'ABRAMO, M.; GRECO, M.F. et al. Detection of *Brucella canis* in a dog in Italy. **New Microbiol.** v.33, n.4, p.337-41, 2010.

CORTES, V.A.; OLIVEIRA, M.C.G.; ITO, F.H.; VASCONCELLOS, S.A. Reações sorológicas para *Brucella canis* em cães errantes capturados na proximidade dos parques públicos, reservas florestais e em áreas periféricas do Município de São Paulo, Brasil. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo**, v.25, p.101-107, 1988.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M.J.; VELOSO, V.M. et al. 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.** v.5, n.8, e1291, 2011.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 50, p.296-311, 1994.

DA SILVA, S.M.; RIBEIRO, V.M.; RIBEIRO, R.R. et al. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Vet. Parasitol.** v.166, n.1-2, p.159-62, 2009.

DE ALMEIDA, M.E.; STEURER, F.J.; KORU, O. et al. Identification of *Leishmania* spp. by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of rRNA internal transcribed spacer 2. **J. Clin. Microbiol.** v. 49, n.9, p.3143-9, 2011.

DE CAMPOS, M.P.; DA SILVA, D.A.; MADEIRA, M.F. et al. First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Volta Redonda, Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.22, n.3, p.424-6, 2013.

DENTINGER, C.M.; JACOB, K.; LEE, L.V. et al. Human *Brucella canis* infection and subsequent laboratory exposures associated with a puppy, New York City, 2012. **Zoonoses Public Health.** v. 2014, p. 1-8, 2014.

DE PAULA, C.C.; FIGUEIREDO, F.B.; MENEZES, R.C. et al. Leishmaniose visceral canina em Maricá, Estado do Rio de Janeiro: relato do primeiro caso autóctone. **Rev. Soc. Bras. Med. Tro.** v.42, n.1, p.77-8, 2009.

DINIZ, S.A.; MELO, M.S.; BORGES, A.M. et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. **Vet. Pathol.** v.42, n.6, p. 650-8, 2005.

DORNELES, S.E.M.; SANTOS, H.; MINHARRO, H. et al. Anticorpos anti-*Brucella canis* e anti- *Brucella abortus* em cães de Araguaína, Tocantins. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v.48, n.2, p.167-71, 2011.

FAKHAR, M.; BANIMUSTAFABI, E.; MOTAZEDIAN, MH. et al. Co-infection of *Leishmania infantum* and *Brucella* spp. in Iran. **Com. Clin. Pathol.** v.18, p. 91-4, 2009.

FARIA, A.R.; ANDRADE, H.M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev. Pan-Amaz Saúde.** v.3, n.2, p. 47-57, 2012.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba-SP (Brasil). **Clín Vet.** v.5, n.28, p.36-44 2000.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Canine and feline endocrinology and reproduction. In: \_\_\_\_\_. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1987. 785 p.

FERNANDES, A.R.F.; AZEVEDO, S.S.; PIATTI, R.M. et al. *Brucella canis* infection in dogs attended in veterinary clinics from Patos, Paraíba state, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** v.42, n.4 p. 1405-8, 2011.

FERNANDES, A.R.F.; FERNANDES, A.G.; ROTONDANO, T.E.F. et al. Inquérito sorológico e molecular da brucelose canina no município de Natal, Estado do Rio Grande do Norte. **Cienc. Rural.** v.43, n.9, p.1629-1635, 2013.

FERREIRA, S.A.; LEITE, R.S.; ITUASSU LT. et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis.** v.6, n.4, e1596, 2012.

FERREIRA, T.; MANDELBAUM, M.A.; MARQUES, A.P.L. et al. Inquérito sorológico da brucelose canina através da utilização de antígeno externo e interno de *Brucella canis* e *Brucella ovis*. **R. bras. Ci. Vet.** v.14, n.3, p.167-8, 2007.

FIGUEIREDO, F.B.; FILHO, C.J.L.B.; SCHUBACH, E.Y.P. et al. Relato de caso autóctone de leishmaniose visceral canina na zona sul do município do Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.43, n.1, p.98-9, 2010a.

FIGUEIREDO, F.B.; MADEIRA, M.F.; MENEZES, R.C. et al. Efficacy of an indirect immunofluorescence test in the diagnosis of canine leishmaniosis. **Vet. J.** v.186, n.1, p.123-24, 2010b.

FIGUEIREDO, F.B.; MADEIRA, M.F.; NASCIMENTO, L.D. et al. Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of igg in serum and eluate samples. **Rev.Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** v.52, n.4, p.193-96, 2010c.

FIGUEIREDO, P.; FICHT, T.A.; RICE-FICHT, A. et al. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-host interactions. **Am. J. Patol.** v.185, n.6, p.1505-17, 2015.

FLORES-CASTRO, R.; SUAREZ, F.; RAMIREZ-PFEIFFER, C. et al. Canine brucellosis bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in Mexico. **City. J. Clin. Microbiol.** v.6, n.6, p.591-7, 1977.

FOSTER, R.A. Sistema reprodutor do macho. In: Zachary JF, McGavin MD. **Bases da patologia em veterinária.** 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. p. 1132-34.

FOSTER, R.A. Common lesions in the male reproductive tract of cats and dogs. **Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.** v. 42, n.3, p.527-45, 2012.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.** v.137, p.214–21, 2006.

FURTADO, M.C.; MENEZES, R.C.; KIUPEL, M. et al. Comparative study of *in situ* hybridization, immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Parasit. Vectors.** v.8, n.620, 2015.

GALLETTI, E.; BONILAUDI, P.; BARDASI, L. et al. Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dog specimens. **Res. Vet. Sci.** v. 91, n.2, p. 243-5, 2011.

GERMANO, P.M.L, VASCONCELLOS, S.A. ISHIZUKA, M.M., PASSOS, E.C.; ERBOLATO, E.B. Prevalência de infecção por *Brucella canis* em cães da cidade de Campinas, SP, Brasil. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São. Paulo.** v.24, p.27-34, 1987.

GODOY, A.M.; PERES, J.N.; BARG, L. Isolamento de *Brucella canis* em Minas Gerais, Brasil. **Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais.** v.29, p.35-42, 1977.

GOMES, J.P.; DRIEMEIER, D.; SOARES, H.C. et al. *Brucella canis*: Isolamento em um cão com epididimite e orquite relato de caso. **Clín. Vet.** v.4, n.18, p.17-20, 1999.

GOMES YM, PAIVA CAVALCANTI M, LIRA RA. et al. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **Vet. J.** v.175, n.1, p.45-52, 2008.

GONTIJO, C.M.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. bras. Epidemiol.** v.7, n.3, p.1-12, 2004.

GONZALEZ, J.L.; GALLEGO, E.; CASTAÑO, M.; RUEDA, A. Testicular amyloidosis in hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani*. **Br. J. Exp. Pathol.** v.64, n.5, p. 518-23, 1983.

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. **Canine leishmaniasis: moving towards a solution.** Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Seville, Spain. 2002; p. 7–14.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Int. J. Parasitol.** v.35, p.1169-80, 2005.

GREENE, C.E.; CARMICHAEL, L.E. Canine Brucellosis. In: \_\_\_\_\_. **Infectious diseases of the dog and cat.** 4th ed. Saunders:Elsevier, 2012. p. 398-410.

GREENE, C.E.; CARMICHAEL, L.E. Canine Brucellosis. In: \_\_\_\_\_. **Infectious diseases of the dog and cat.** Philadelphia (PA): W.B. Saunders Co, 2006. p. 369–90.

GRIMALDI, Jr.G.; TEVA, A.; FERREIRA, AL. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the



serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.106, n.1, p. 54-59, 2012.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GENARO, O. et al. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania(Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **J. Comp. Pathol.** v.135, p.100–7, 2006.

GYURANECZ, M.; RANNALS, B.D.; ALLEN, C.A. et al. Within host evolution of *Brucella canis* during a canine brucellosis outbreak in a kennel. **BMC Vet. Res.** v.9, p.76, 2013.

GYURANECZ, M.; SZEREDI, L.; RÓNAI, Z. et al. Detection of *Brucella canis*-induced reproductive diseases in a kennel. **J. Vet. Diagn. Invest.** v.23, n.1, p.143-7, 2011.

HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol.** v.27, n.9, p. 403–9, 2011.

HOFER, E.; BAGÓ, Z.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S. et al. First detection of *Brucella canis* infections in a breeding kennel in Austria. **New Microbiol.** v.35, n.4, p.507-10, 2012.

HOLLETT, R.B. Canine brucellosis: outbreaks and compliance. **Theriogenology.** v.66, n.3, p.575-87, 2006.

HOLST, B.S.; LÖFQVIST, K.; ERNHOLM, L. et al. The first case of *Brucella canis* in Sweden: background, case report and recommendations from a northern European perspective. **Acta Vet. Scand.** v.54, n.1, p.1-9, 2012.

HUBBERT, N.L.; BECH-NIELSEN, S.; BARTA, O. Canine brucellosis: comparison of clinical manifestations with serologic test results. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.177, n.2, p.168-71, 1980.

ISLAM, M.A.; KHATUN, M.M.; WERRE, S.R. A review of *Brucella* seroprevalence among humans and animals in Bangladesh with special emphasis on epidemiology, risk factors and control opportunities. **Vet. Microbiol.** v.166, n.3-4, p.317-26, 2013.

JIAN, H. Identification and characterization of 200 strains of *Brucella canis* under test from china. **Weishengwu Xuebao Pao.** v.32, p.370–5, 1992.

JOHNSON, C.A.; WALKER, R.D. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. Small Anim.** v.14, p.763-72, 1992.

JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals.** 4rd. ed. New York: Academic Press; 1993.

KADEN, R.; AGREN, J.; BAVERUD, V.; HALLGREN, G.; FERRARI, S.; BÖRJESSON, J. et al. Brucellosis outbreak in a Swedish kennel in 2013: determination of genetic markers for source tracing. **Vet. Microbiol.** v.174, n.3-4, p. 523-30, 2014.

- KANG, S.I.; LEE, S.E.; KIM, J.Y. et al. A new *Brucella canis* species-specific PCR assay for the diagnosis of canine brucellosis. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** v.37, n.4, p.237-41, 2014.
- KAUFFMAN, L.K.; BJORK, J.K.; GALLUP, J.M. et al. Early detection of *Brucella canis* via quantitative polymerase chain reaction analysis. **Zoonoses Public. Health.** v.61, n.1, p.48-54, 2014.
- KEID, L.B.; CHIEBAO, D.P.; BATINGA, M.C.A. et al. *Brucella canis* infection in dogs from commercial breeding kennels in Brazil. **Transbound Emerg. Dis.** v.64, p.691-97, 2017.
- KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VASCONCELLOS, S.A. et al. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. **Res. Vet. Sci.** v.86, n.1, p.22-6, 2009.
- KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VIEIRA, N.R. et al. Diagnosis of canine brucellosis: Comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. **Vet. Res. Commun.** v.31, p.951-65, 2007a.
- KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VASCONCELLOS, S.A. et al. A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. **Theriogenology.** v.67, n.7, p.1203-10, 2007b.
- KIM, S.; LEE, D.S.; SUZUKI, H. et al. Detection of *Brucella canis* and *Leptospira interrogans* in canine semen by multiplex nested PCR. **J. Vet. Med. Sci.** v.68, n.6, p.615-8, 2006.
- KOUTINAS, A.F.; KOUTINAS, C.K. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Vet. Pathol.** v.51, n.2, p.527-38, 2014.
- KRUEGER, W.S.; LUCERO, N.E.; BROWER, A. et al. Evidence for unapparent *Brucella canis* infections among adults with occupational exposure to dogs. **Zoonoses Public. Health.** v.61, n.7, p.509-18, 2014.
- LABAT, É.; CARREIRA, J.T.; MATSUKUMA, B.H. et al. Qualidade espermática de sêmen de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 62, n.3, p. 609-14, 2010.
- LARSSON, M.H.M.A.; LARSSON, C.E.; MIRANDOLA, R.M.S. et al. Canine Brucellosis in São Paulo: serologic survey of kennel and stray dogs. **Int. J. Zoonoses,** v.8, p.85-90, 1981.
- LAWACZECK, E.; TOPOREK, J.; CWIKLA, J. et al. *Brucella canis* in a HIV-infected patient. **Zoonoses Public. Health.** v.58, n.2, p.150-2, 2011.
- LEVY, E.; MYLONAKIS, M.E.; SARIDOMICHELAKIS, M.N. et al. Nasal and oral masses in a dog. **Vet. Clin. Pathol.** v.35, n.1, p.115-8, 2006.
- LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N. et al. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta tropica.** v. 92, p. 43-53, 2004.

LOMBARDO, G.; PENNISI, MG.; LUPO, T. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Vet. Parasitol.** v.184, n.1,p.10–17, 2012.

LOPEZ, G.; AYALA, S.M.; EFRON, A.M. et al. A serological and bacteriological survey of dogs to detect *Brucella* infection in Lomas de Zamora, Buenos Aires province. **Rev. argent. microbiol.** v. 41, n. 2, p. 97-101, 2009.

LUCERO, N.E.; CORAZZA, R.; ALMUZARA, M.N. et al. Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. **Epidemiol. Infect.** v.138, n.2, p.280-5, 2010a.

LUCERO, N.E.; MALDONADO, P.I.; KAUFMAN, S. et al. *Brucella canis* Causing Infection in an HIV-Infected Patient. **Vector Borne Zoonotic Dis.** v.10, n.5, p.527-9, 2010b

LUCERO, N.E.; AYALA, S.M.; ESCOBAR, G.I. et al. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. **Epidemiol. Infect.** v.136, n.4, p.496-503, 2008.

LUCERO, N.E.; ESCOBAR, G.I.; AYALA, S.M. et al. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. **J. Med. Microbiol.** v.54, p.457-61, 2005a.

LUCERO, N.E.; JACOB, N.O.; AYALA, S.M. et al. Unusual clinical presentation of brucellosis caused by *Brucella canis*. **J. Med. Micro.** v.54, n.5,p.505–8, 2005b.

MACHADO, M.A. Porcentagem de cães soropositivos para *Brucella canis* apresentando problemas reprodutivos atendidos no hospital veterinário da universidade estadual de Londrina. **Ars. Veterinaria.** v.29, n.3, p.161-8, 2013.

MADEIRA, M.F.; FIGUEIREDO, F.B.; PINTO, A.G.S. et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? **Res. Vet. Sci.** v.87,n.2, p. 260-2, 2009a.

MADEIRA, M.F.; SOUSA, M.A.; BARROS, J.H. et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology.** v.136, n. 4, p.411–23, 2009b.

MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.P. et al. *Post mortem* parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet. Parasitol.** v.138, n.3-4, p.366- 70, 2006.

MAGRO, A.G.; ASSIS, V.P.; SILVA, L.C. et al. *Leishmania infantum* is present in vaginal secretions of naturally infected bitches at lower levels in oestrogenized bitches than in non-oestrogenized bitches. **Acta Parasitol.** v.62, n.3, p.625-29, 2017.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. **J. Trop. Med.** v.2012, p.1-7, 2012.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet. Parasitol.**v.158, n.4, p.274-87, 2008.

MAIA-ELKYHOURY, A.N.S.; ALVES, W.A.; SOUSA-GOMES, M.L. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública**. v.24, n.12, p.2941-47, 2008.

MAIA, G.R.; ROSSI, C.R.S.; ABBADIA, F. et al. Prevalencia da brucelose canina nas cidades do Rio de Janeiro e Niteroi-RJ. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.23, p.425-7, 1999.

MAKLOSKI, C.L. Canine brucellosis management. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.** v.41, n.6, p.1209-19, 2011.

MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Vet. Parasitol.** v.65, n.1-2, p.1-9, 1996.

MANIAS, V.; NAGEL, A.; MOLLERACH, A. et al. Endocarditis por *Brucella canis*: primer caso documentado en un paciente adulto en Argentina. **Rev. Argent. Microbiol.** v.45, n.1, p. 50-3, 2013.

MANNA, L.; PACIELLO, O.; MORTE, R.D. et al. Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. **Parasit. Vectors.** v.5, p. 216, 2012.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F. et al. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Res. Vet. Sci.** v.87, n.1, p.76-8, 2009.

MARASSI, C.D.; MORAES, I.A.; LILENBAUM, W. Soroprevalência de brucelose canina no município do Rio de Janeiro pelo método de Imunodifusão em Gel Agarose. **R. bras. Ci. Vet.** v. 10, n. 1, p. 63-64, 2003.

MARCHAL, S.A.; MARCHAL, T.; MOORE, P.F. et al. Infection of canine Langerhans cells and interdigitating dendritic cells by *Leishmania infantum* in spontaneous canine leishmaniasis. **Rev. Med. Vet.** v.148, p.29-36,1997.

MARTINEZ, V.; QUILEZ, J.; SANCHEZ, A. et al. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. **Parasit. Vectors.** v.4, n.57, p.1-5, 2011.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **J. Clin. Microbiol.** v.42, n.11, p.5249-55, 2004.

MARZETTI, S.; CARRANZA, C.; RONCALLO, M. et al. Recent trends in human *Brucella canis* infection. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** v.36, n.1, p.55-61, 2013.

MCKEE, M.A.; BALLARD, J.L. Mycotic Aneurysms of the Tibioperoneal Arteries. **Ann. Vasc. Surg.** v.13, n.2, p.188-90, 1999.

MEGID, J.; SALGAO, V.R.; KEID, L.B. et al. Abortamento canino por *Brucella canis*: relato de caso. **Vet. e Zootec.** v.15. n.3, p.445-8, 2008.

MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; MORAES, C.C.G. et al. Brucelose canina - Relato de Caso. **Arq. Inst. Biol.** v.69, n.4, p.103-6, 2002.

MEKUZAS, Y., GRADONI, L., OLIVA, G., V. et al. *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 15, n. 2, p. 30–31, 2009.

MELLO, C.X.; MENDES JUNIOR, A.A.V.; FURTADO, M.C. et al. Outbreak of canine visceral leishmaniasis in Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.47, n.6, p. 1-3, 2014.

MELO, S.M.B.; AGUIAR, P.H.P.; NASCIMENTO, R.M. et al. Avaliação sorológica por imunodifusão em gel de agarose para diagnóstico de *Brucella canis* em cães no distrito de Monte Gordo, Camaçari, Bahia. **Arqs. Esc. Med. Vet. Univ. Fed. Bahia.** v.19, n.1, p.119-27, 1998.

MENEZES, R.C.; FIGUEIREDO, F.B.; WISE, A.G. et al. Sensitivity and specificity of in situ hybridization for the diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs. **J Clin Microbiol.** v.51, n.1, p.206-11,2013.

MINHARRO, S. Diagnóstico da brucelose canina: dificuldades e estratégias. **Vet. Bras. Reprod. Anim.** v.29, n.3/4, p.167-73, 2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa nº. 50, de 24 de setembro de 2013. Resolve alterar a lista de doenças passíveis da aplicação de medidas de defesa sanitária animal. **Diário Oficial da União**, Seção1, 25 set. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde. 2017. 189p. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf)> Acesso em: 20 jul 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº.1.271, de 6 de junho de 2014. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Seção1, 9 jun. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota técnica nº 5/2012 - GDTVZ/DTI/CVE/SVEA/SVS-SES RJ. Intensificação da Vigilância para Leishmaniose Visceral no Estado do Rio de Janeiro. 2012:1-4.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8ª ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde. 2010. 444p. Il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde). Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas\\_infecciosas\\_parasitaria\\_gui\\_bolso.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_gui_bolso.pdf)> Acesso em 16 abr 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Portaria 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. **Diário Oficial da União**, Seção 1, 14 jul. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Ciência e Tecnologia. **Classificação de risco dos agentes biológicos**. Brasília: Ministério da Saúde. 2006a. 36p. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/classificacao\\_risco\\_agentes\\_biologicos.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/classificacao_risco_agentes_biologicos.pdf)> Acesso em 16 abr 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica: **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde. 2006b. 120p. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_viscer\\_al.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer_al.pdf)> Acesso em 16 abr 2015.

MIR, F.; FONTAINE, E.; REYES-GOMEZ, E. et al. Subclinical leishmaniasis associated with infertility and chronic prostatitis in a dog. **Fontbonne A. J. Small Anim. Pract.** v.53, n.7, p.419-22, 2012.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends Parasitol.** v.24, n.8, p.371-7, 2008.

MOHAMED ZAHIDI, J.; BEE YONG, T.; HASHIM, R. et al. Identification of *Brucella* spp. isolated from human brucellosis in Malaysia using high-resolution melt (HRM) analysis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v.81, n.4, p.227-33, 2015.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J. et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.88, p. 491-3, 1994.

MOMO, C.; ROCHA, N.A.; MOREIRA, P.R. et al. Morphological changes and parasite load of the adrenal from dogs with visceral leishmaniasis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.23, n.1, p. 30-5, 2014.

MORAES, C.C.G.; MEGID, J.; SOUZA, L.C. et al. Prevalência da brucelose canina na microrregião da Serra de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Arq. Inst. Biol. S. Paulo**, v.69, n.2, p.7-10, 2002.

MORAES, I.A.; LARANJA, H.F.; VIEIRA, D.K. et al. Identificação de cães potenciais transmissores de brucelose na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 28., Salvador, Brasil. **Anais...** Salvador: Sociedade de Medicina Veterinária da Bahia; 2001. p. 163.

MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA, J.F. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Vet Parasitol.** v.145, n.3-4, p. 245-52, 2007.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brazil, 1994.

- OLIVEIRA, V.D.C.; BOECHAT, V.C.; MENDES JUNIOR, A.A.V. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. **PLoS One**. v.12,n.4, e0175588, 2017.
- OLIVEIRA, V.V.G.; MACEDO, S.R.B.; ARAÚJO, F.R. et al. Histopathological evaluation and parasite quantification (qPCR) in the male dog's genital system after natural infection with *Leishmania infantum*. **Cienc. Rural**. v.46, n.4, p.641-47, 2016a.
- OLIVEIRA, V.V.G.; MACEDO, S.R.B.; ARAÚJO, F.R. et al. Correlation between chronic inflammation, immunostaining and parasite load in the genital system of female dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Cienc. Rural**. v. 6, n.11, p.2029-35, 2016b.
- OLIVEIRA, M.Z.; VALE, V.; KEID, L. et al. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. **Res. Vet. Sci**. v.90, n.3, p.425-31, 2011.
- OTRANTO, D.; PARADIES, P.; CAPRARIIS D. et al. Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. **Clin Vaccine Immunol**. v.16, n.3, p. 337-43, 2009.
- PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGU, L.; FONDATI, A. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc**. v. 236,p.1184–91, 2010.
- PANARO, M.A.; BRANDONISIO, O.; CIANCIULLI, A. et al. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Parasitology**. v.136, n.8, p.823-31, 2009.
- PANGRAZIO, K.K.; COSTA, E.A.; AMARILLA, S.P. et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. **Vet. Parasitol**. v.165, n.3-4, p.327-31, 2009.
- PÉREZ, J.; QUEZADA, M.; LÓPEZ, J. e. al. Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. **J. Vet. Diagn. Invest**. v.10, n.1, p.17-21, 1998.
- PIAMPIANO, P.; MCLEARY, M.; YOUNG, L.W. et al. Janner D. Brucellosis: Unusual Presentations in Two Adolescent Boys. **Pediatr. Radiol**. v.30, n.5, p.355-7, 2000.
- PINTO, A.J.W.; FIGUEIREDO, M.M.; SILVA, F.L. et al. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Acta Vet. Scand**. v.53, n.1, p.67, 2011.
- PORTO, W.J.N.; JUNIOR, J.W.P.; MOTA, R.A. Associação entre distúrbios reprodutivos e anticorpos anti-*Brucella* sp em cães atendidos em clínicas particulares da cidade de Maceió-AL. **R. Bras. Ci. Vet**. v.15, n.1, p. 6-9, 2008.
- QUEIROZ, N.M.G.P.; SILVEIRA, R.C.V.; NORONHA JR, A.C.F. et al. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. **Vet. Parasitol**. v.178, n.1-2, p.1-8, 2011.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018 <https://www.R-project.org/> acesso em 20 out 2018.

READY, P.D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annu. Rev. Entomol.** v.58, p.227–50, 2013.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res. Vet. Sci.** v.81, n.1, p.68-75, 2006.

REYNES, E.; LÓPEZ, G.; AYALA, S.M. et al. Monitoring infected dogs after a canine brucellosis outbreak. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** v.35, n.6, p.533-7, 2012.

RIERA, C.; VALLADARES, J.E. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. **Parasitol. Today**.v.12, n.10, p. 412, 1996.

RODRIGUES, F.S; SOUZA, G.V; MAGALHÃES, I.L.A; COLARES, R.R; SANTIAGO, S.L.T. Brucelose canina: revisão de literatura. **Rev. Bras. Hig. Sanid. Anim.** v.10, n.4, p.870-888, 2016

RODRÍGUEZ, H.J.; MOZOS, E.; MÉNDEZ, A. et al. *Leishmania* infection of canine skin fibroblasts in vivo. **Vet. Pathol.** v.33, n.4, p.469-73,1996.

ROSATI, S.; ORTOFFI, M.; PROFITI, M. et al. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v.10, n.6, p.1153-6, 2003.

ROSYPAL, A.C.; TROY, G.C.; ZAJAC, A.M. et al. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **J. Parasitol.** v.91, n.4, p.970-2, 2005a.

ROSYPAL, A.C.; TROY, G.C.; DUNCAN. Jr.R.B. et al. Utility of diagnostic tests used in diagnosis on infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania infantum*. **J. Vet. Intern. Med.** v.19, p.802–9, 2005b.

ROURA, X.; BREITSCHWERDT, E.; LLORET, A. et al. Serological Evidence of Exposure to *Rickettsia*, *Bartonella*, and *Ehrlichia* Species in Healthy or *Leishmania infantum*-Infected Dogs from Barcelona, Spain. **Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.** v. 3, n. 2,p. 129-37, 2005

SAMMARTINO, L.E.; GIL, A.; ELZER, P. **Capacity building for surveillance and control of bovine and caprine brucellosis**. Food and Agriculture Organisation (FAO), Expert and Technical Consultation, 14–16 June, Rome. FAO, Rome Appendix 3, 55–56. 2005. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0083e/A0083E01.pdf>> Acesso em 16 abr 2015.

SANDOVAL, L.A.; RIBEIRO, L.O.C.; AMARAL, L.B.S. et al. Incidência da brucelose canina na cidade de São Paulo. **O Biológico**, v.42, n.32, p.126-132, 1976.

SANTOS, R.L.; SILVA, F.L.; PAIXAO, T.A. et al. Brucelose: zoonose e bioterrorismo. **Cad. Tec. Vet. Zootec.** v.47, p.83-98, 2005.



SARIDOMICHELAKIS MN, KOUTINAS AF. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **Vet Dermatol.** v.25, n.2, p.61-71, 2014.

SAYAN, M.; ERDENLIG, S.; STACK, J. et al. A serological diagnostic survey for *Brucella canis* infection in Turkish patients with brucellosis-like symptoms. **Jpn. J. Infect. Dis.** v.64, n.6, p. 516-19, 2011a.

SAYAN, M.; ERDENLIĞ, S.; ETILER, N. Investigation of *Brucella canis* seropositivity by in-house slide agglutination test antigen in healthy blood donors. **Mikrobiyol. Bul.** v.45, n.4, p.655-63, 2011b.

SCHEFTEL, J. *Brucella canis*: Potential for Zoonotic Transmission. **Comp. Contin. Edu. Practicing Vet.** v.25, n.11, p.846-52, 2003.

SEBEK, Z.; SIXI, W.; STUNZNER, D. et al. Zur Frage der endemischen Herde der spezifischen Hundebucellose (*Brucella canis*) in Europe. **Monatshefte fur Veterinarmedizin.** v.38, p.374-8, 1983.

SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T.; NAKAO, N. et. al. Significance of urine culture for detecting infection with *Brucella canis* in dogs. **Jpn. J. Vet. Sci.** v.40, n.3, p.353-5, 1978.

SHIN, S.; CARMICHAEL, L.E. **Canine Brucellosis Caused by *Brucella Canis***. Recent Advances in Canine Infectious Diseases. International Veterinary Information Service. 1999. Disponível em: <<http://www.ivis.org/docarchive/A0101.1199.pdf>> \_ Acesso em 16 abr 2015.

SILVA, R.C.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; KIKUTI, M. et al. Detection of *Leishmania* (L.) *infantum* in stray dogs by molecular techniques with sensitive species-specific primers, **Veterinary Quarterly.** v.37, n.1, p. 23-30, 2016.

SILVA, C.P.A.; ALMEIDA, A.B.P.F.; GODOY, I. et al. Detecção molecular de *Brucella canis* em cães do Município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Cienc. Rural.** v.42, n.6, p.1051-6, 2012.

SILVA, F.L.; OLIVEIRA, R.G.; SILVA, T.M. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.** v.160, n.1-2, p.55-9, 2009.

SILVA, F.L.; RODRIGUES, A.A.; REGO, I.O. et al. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet. Parasitol.** v.151, n.1, p.86-90, 2008.

SOLCÀ, M.S.; BASTOS, L.A.; GUEDES, C.E. et al. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **PLoS One.** v.9, n.7, e103635, 2014.

SOUZA, C.C.; BARRETO, T.O.; DA SILVA, S.M. et al. A potential link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis. **Int. J. Exp. Path.** v.95, n.1, p.260-70, 2014.

SOUZA, M.B.; CARVALHO, R.W.; MACHADO, R.N.M. et al. Flebotomíneos de áreas com notificações de casos autóctones de leishmaniose visceral canina e leishmaniose tegumentar

americana em Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Entomol.** v.53, n.1, p.147-50, 2009.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v.9, p.951-8, 2002.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.E. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **J. Immunol. Methods.** v.292, n.1-2, p.17-23, 2004.

TAFURI, W.L.; DE OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N. et al. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Vet. Parasitol.** v.96, n.3, p.203-12, 2001.

TAYLOR, D.J. Serological evidence for the presence of *Brucella canis* infection in dogs in Britain. **Vet. Rec.** v.106, p.102-3, 1980.

THOMÉ, H.E.; DISANTIS, G.W.; MOURA, V.M.B.D. et al. Avaliação histopatológica testicular e epididimária em cães adultos sem raça definida (SRD) da região de São João da Boa Vista, SP. **Ciê. Anim. Bras.** v.8, n.4, p.745-55, 2007.

TOEPP, A.J.; MONTEIRO, G.R.G.; COUTINHO, J.F.V. et al. Comorbid infections induce progression of visceral leishmaniasis. **Parasit. Vectors.** v.12, n.1, p. 54, 2019.

TONINI, M.A.; LEMOS, E.M.; REIS, A.B. et al. First description of autochthonous canine visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.45, n.6, p.754-6, 2012.

TRONCARELLI, M.Z.; CAMARGO, J.B.; MACHADO, J.G. et al. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.** v.164, p.118-23, 2009.

TUEMMERS, C.; LÜDERS, C.; ROJAS, C. et al. Detección de *Brucella canis* por método de inmunocromatografía en perros vagos capturados en la ciudad de Temuco, Chile, 2011. **Rev. Chilena Infectol.** v.30, n.4, p.395-401, 2013.

VASCONCELOS, R.T.J.; ALVES, C.J.; CLEMENTINO, I.J. et al. Soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por *Brucella canis* em cães da cidade de Campina Grande, estado da Paraíba. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.** v.9, n.3, p.436-42, 2008.

VERÇOSA, B.L.; MELO, M.N.; PUERTO, H.L. et al. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: a histomorphometric analysis. **Vet. Parasitol.** v.189, n.2-4, p.162-70, 2012.

VIDA, B.; TOEPP, A.; SCHAUT, R.G. et al. Immunologic progression of canine leishmaniosis following vertical transmission in United States dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.169, p.34-8, 2016.

VIÑUELAS, J.; GARCÍA-ALONSO, M.; FERRANDO, L. et al. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.** v.101, n.1, p.23-7, 2001.

WALD, V.B.; FERNANDES, J.C.T. Sorologia da brucelose canina no município de Porto Alegre, RS. **Arq. Fac. Vet. Univ. Fed. Rio Grande do Sul.** v. 4, n.5, p.92- 95, 1976/77.

WERNECK, G.L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cad. Saúde Pública.** v.24, n.12, p.2937-40, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Expert Committee on the Control of Leishmaniases. **Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO expert comitee.** Technical Report Series 949. Geneva: World Health Organization; 22-6 March 2010, 202p.

XAVIER, S.C.; ANDRADE, H.M.; MONTE, S.J.H. et al. Comparison of paraffinembedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Vet. Res.** v. 2, p.17, 2006.

YAMAUCHI, C.; SUZUKI, T.; NOMURA, T. et al. Canine brucellosis in a beagle breeding colony. **Jpn. J. Vet. Sci.** v.36, n.2, p.175-82, 1974.

YANG, Y.; WANG, Y.; POULSEN, E. et al. Genotyping *Brucella canis* isolates using a highly discriminatory multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) assay. **Sci. Rep.** v.7, n.1, p.1067, 2017.

YING, W.; NGUYEN, M.Q.; JAHRE, J.A. *Brucella canis* endocarditis: case report. **Clin. Infect. Dis.** v.29, n.6, p.1593-4, 1999.

ZACHARY, J.F. Mecanismos das infecções bacterianas. In: Zachary JF, McGavin MD. **Bases da patologia em veterinária.** 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. p. 189-90.

ZANETTE, M.F.; LIMA, V.M.F.; LAURENTI, M.D. et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.47, n.1, p.105-7, 2013.

ZANGIROLAMI FILHO, D.; AVANTE, M.L.; BELTRAN, M.P. Orquite. **Rev. Cient. Elet. de Med. Vet.** v.VII, n. 12, 2009.

## APÊNDICE A

### Artigo 1

O artigo foi submetido à *Parasites & Vectors*.

#### **High frequency, active infection and similar loads of *Leishmania infantum* in the genital tract of naturally infected male and female dogs: Is bidirectional venereal transmission possible?**

Viviane C. Boechat<sup>1</sup>, Sandro A. Pereira<sup>1</sup>, Artur A.V.M. Júnior<sup>1</sup>, Shanna A. Santos<sup>1</sup>, Luciana F.C. Miranda<sup>2</sup>, Fabiano B. Figueiredo<sup>3</sup>, Luiz C. Ferreira<sup>4</sup>, Francisco C.C. Rodrigues<sup>4</sup>, Raquel V.C. Oliveira<sup>5</sup>, Rayane Teles-de-Freitas<sup>6</sup>, Rafaela V. Bruno<sup>6,7</sup>, Fernanda N. Morgado<sup>8</sup> and Rodrigo C. Menezes<sup>1\*</sup>

\*Correspondence: rodrigo.menezes@ini.fiocruz.br

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil.

Full list of author information is available at the end of the article

## Abstract

**Background:** Visceral leishmaniasis caused by the protozoan *Leishmania infantum* is a zoonosis in which the domestic dog is the primary source of infection for the sandfly vector in urban areas. This study aimed to evaluate the frequency, active infection and load of *L. infantum* in the genital tract of naturally infected male and female dogs from the same endemic area, as well as to identify histological genital alterations associated with this protozoan.

**Methods:** We studied 45 male and 25 female *L. infantum*-seropositive noncastrated dogs from an endemic area (Rio de Janeiro, Brazil). Tissue samples from the testis, epididymis, prostate, vulva, vagina and uterus were examined by singleplex qPCR for the detection of *L. infantum* DNA. Histopathology, immunohistochemistry and culture were performed for the detection of active infection with this parasite.

**Results:** Twenty-five (100%) females and 44 (98%) males were positive for *L. infantum* in the genital tract (epididymides: 98%; vulva: 92%; vagina: 92%; testes: 91%; uterus: 84%; prostate: 66%). Active infection in the genital tract was confirmed in 69% of males and 64% of females (32% in the uterus). More intense parasite loads were observed in the testis, followed by the vulva, epididymis and vagina, but without a significant difference between these tissues. The *L. infantum* load was significantly lower in the prostate compared to the other organs of the male and female genital tract. Only the parasite load in the vagina was significantly associated with the number of clinical signs. Granulomatous inflammation predominated in all organs, except for the prostate. The intensity of the inflammatory infiltrate was greater in tissues in which active infection was detected. Only in the testes and epididymis was the inflammatory infiltrate significantly more intense among dogs with a higher parasite load in these tissues.

**Conclusions:** The high frequency, detection of active infection and similarity of *L. infantum* loads in the genital tract of infected males and females suggest the possibility of bidirectional venereal transmission of this parasite. Additionally, vertical transmission may be frequent since active *L. infantum* infection was a common observation in the uterus.

**Keywords:** Visceral leishmaniasis, Dogs, Genital tract, Parasite load, qPCR, Histopathology, Immunohistochemistry

## Background

Canine visceral leishmaniasis (CVL) caused by the protozoan *Leishmania infantum* is a zoonosis in which the domestic dog (*Canis familiaris*) is the primary reservoir in urban areas. In addition to classical transmission through the bite of infected sandflies, venereal and vertical transmission of the disease is possible [1–4]. Amastigote forms or DNA of *Leishmania* have been detected in the epididymides, prepuce, glans, testes and prostate of the male genital tract [1, 3, 5–10], and in the vulva, vagina, vaginal secretion, placenta, uterus and ovary of the female genital tract [8, 11–14].

An accurate marker of *L. infantum* infectivity in dogs is the parasite load that can be evaluated by singleplex quantitative polymerase chain reaction (qPCR). In addition to providing a diagnostic result, this technique permits to determine the number of copies of the DNA target sequence. In the male genital tract of dogs naturally infected with *L. infantum*, the highest parasite load was detected in the testis and epididymis and was not correlated with inflammatory lesions in these organs [9]. In the female genital tract, the *L. infantum* load was reported to be lower than in the male genital tract and was more intense in the vulva and vagina, but was not associated with inflammatory intensity in these organs [12]. Some authors suggest tropism of *L. infantum* for the male genital tract and unidirectional venereal transmission from male to female based on the high frequency of detection of this parasite in the male genital tract and low frequencies in the female genital tract [1, 11, 15]. However, other studies found a high frequency of parasitism in the genital tract of females, suggesting tropism of *L. infantum* also for the female genital tract and the possibility of venereal transmission from female to male [8, 12]. The detection of vaginal secretion contaminated with *L. infantum* in naturally infected bitches reinforces the hypothesis of venereal transmission from female to male [14]. Taken together, these findings demonstrate the lack of consensus regarding the role of females in venereal transmission of *L. infantum* to males, which requires further investigation.

The quantification of *L. infantum* load by qPCR in conjunction with the evaluation of active infection in the genital tract by histological techniques and parasitological culture are fundamental to determine the potential of venereal or vertical transmission of the parasite between dogs. However, studies on the frequency of *L. infantum* in the genital tract of dogs that simultaneously evaluate parasite load, the presence of active infection and histological alterations associated with this parasite are scarce [9, 12]. In addition, these studies have evaluated small populations and only males or females from different endemic areas.

Consequently, comparison of the role of each sex in venereal transmission of the parasite in the same endemic area is limited.

Therefore, this study aims to describe the frequency, presence of active infection and parasite load of *L. infantum*, as well as the histological alterations associated with parasitism in different organs of the genital tract of naturally infected male and female dogs from the same endemic area.

## **Methods**

### **Animals**

This was descriptive study conducted between August 2015 and December 2016 using a non-probability sample of 70 dogs (45 males and 25 females). The sample included 57 mongrels, three Miniature Pinschers, three Rottweilers, two Labrador Retrievers, two Cane Corso, one German Shepherd, one Dachshund, and one Pit Bull. The age of the dogs ranged from one to seven years in 60 (86%) animals, eight to 11 years in seven (10%), and 12 to 14 years in three (4%). The dogs were from the municipality of Barra Mansa (22°32'25.19" S and 44°10'35.33" W), state of Rio de Janeiro, Brazil, an area endemic for visceral leishmaniasis with reports of human and canine cases and presence of the vector *Lutzomyia longipalpis* [16,17]. All dogs tested seropositive for anti-*Leishmania* antibodies by the rapid dual-path platform (DPP<sup>®</sup>) assay and enzyme immunoassay (ELISA), both produced by BioManguinhos (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil). These seropositive animals were referred for euthanasia to the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (INI-Fiocruz) as a control measure established by the Brazilian Ministry of Health [18].

### **Sample collection**

At INI-Fiocruz, the dogs were restrained mechanically and first evaluated clinically, with inspection of the skin and mucosae and palpation of superficial lymph nodes and abdominal organs. The following clinical signs of CVL were considered: thinness or cachexia; diffuse or localized hair loss; cutaneous lesions such as ulcers and desquamation; onychogryphosis; enlargement of the superficial lymph nodes, liver or spleen on palpation; pale ocular or oral mucosae, and skeletal muscle atrophy [19, 20]. The animals were divided into two groups according to the clinical signs of CVL: no or few clinical signs (up to three clinical signs) and multiple clinical signs (more than three clinical signs).

After clinical evaluation, the dogs were sedated by intramuscular administration of ketamine hydrochloride (10 mg/kg) and acepromazine maleate (0.2 mg/kg), euthanized with

an intravenous overdose of sodium thiopental and potassium chloride, and necropsied. During necropsy, three fragments were collected from each tissue of the male (right and left epididymides, right and left testes, and prostate) and female genital tract (vulva, vagina, and uterine corpus). One fragment was immersed in sterile saline and cultured for the detection of *Leishmania*. The second fragment was stored at -20°C for subsequent *L. infantum* DNA detection by singleplex qPCR. The third fragment was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin [21] for immunohistochemistry (IHC) and histopathology (HP).

### **Parasitological culture and identification of *Leishmania* species**

The fragments were cultured at 26-28°C in Novy-MacNeal-Nicolle medium plus Schneider's *Drosophila* medium (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin and streptomycin as antibiotics [22]. Parasites isolated in culture were identified as *L. infantum* by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) [23].

### **Singleplex qPCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* load**

First, DNA was extracted from the collected tissues using the DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and QIAcube semi-automated extraction platform (Qiagen) according to manufacturer instructions. The DNA was quantified in a Qubit® 2.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) using the dsDNA HS Qubit® Kit (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer instructions. Amplification was performed with the StepOne™ system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) using one primer pair and the TaqMan® MGB probe (Thermo Fisher Scientific), following a previously described protocol [24].

Parasite load was quantified by constructing a standard curve with serial dilutions ( $10^1$  to  $10^5$  parasites) of *L. infantum* DNA (MHOM/BR/1974/PP75). Positive and negative controls were included in each amplification plate and a threshold of 0.1 was established. Samples in which DNA amplification occurred after the 37<sup>th</sup> cycle were classified as undetectable. The *L. infantum* load is expressed as the natural logarithm of the number of parasite genome equivalents (gEq)/ng.

Samples with an undetectable result in the amplification were submitted to DNA quality testing in another qPCR using the TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) [25]. The results are expressed as positive or negative and samples showing amplification were considered free of DNA degradation and PCR inhibitors.



### **Immunohistochemistry**

For IHC, the slides were submitted to deparaffinization, rehydration, blocking of endogenous peroxidase, antigen retrieval, blockade of nonspecific protein binding, and incubation with polyclonal rabbit anti-*Leishmania* serum diluted 1:500 following a previously described protocol [8]. A biotin-streptavidin-peroxidase system (UltraVision™ Plus Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP, Ready-to-Use Kit, Thermo Fisher Scientific) was used for the detection of *Leishmania* according to manufacturer recommendations.

### **Histopathology**

Histological sections (5 µm thick) were affixed to microscopic slides and stained with hematoxylin-eosin [21]. The inflammatory infiltrate in tissues was classified as follows: granulomatous, predominance of macrophages; non-granulomatous, predominance of other types of inflammatory cells (lymphocytes, plasma cells, and neutrophils). The intensity of inflammatory infiltration was classified as absent or mild (absent cellular infiltrate or mild and dispersed foci) and moderate to intense (dense and diffuse cellular infiltrate).

### **Statistical analysis**

Data were analyzed using the free R software, version 3.5.1 [25]. The following variables are reported as simple frequencies: clinical classification (no or few clinical signs of CVL; multiple clinical signs of CVL), a positive result in the diagnostic assays, and histological alterations. Boxplots were used for comparison of log parasite loads in the samples of each organ. The correlation between *L. infantum* loads in the genital tract samples examined was evaluated using Spearman's correlation coefficient. The correlations ranged from -1 to 1, with positive values indicating a positive correlation and negative values an inverse correlation. The Shapiro-Wilk test revealed a non-normal distribution of the parasite load data. Thus, the nonparametric Mann-Whitney test ( $P < 0.05$ ) was applied to compare log parasite loads between male and female organs and according to the intensity of clinical signs and inflammatory infiltrate. A level of significance of 5% was adopted in this study.

### **Results**

Clinical examination of the 70 dogs revealed clinical signs in 59 (84.3%): thinness ( $n = 36$ ), skin ulcer ( $n = 34$ ), hair loss ( $n = 33$ ), onychogryphosis ( $n = 31$ ), lymphadenomegaly ( $n = 31$ ), furfuraceous desquamation ( $n = 26$ ), splenomegaly ( $n = 18$ ), cachexia ( $n = 12$ ), keratoconjunctivitis ( $n = 11$ ), and hepatomegaly ( $n = 4$ ). Thirty-four (57.6%) of the 59 dogs

exhibited up to three clinical signs and 25 (42.4%) had more than three clinical signs compatible with CVL.

In the genital tract of the 25 females and 45 males, 100% of females and 98% of males tested positive for *L. infantum* by at least one of the diagnostic techniques used (Fig. 1). The only negative animal in all assays was a male without clinical signs. There was no parasitological culture result for one of the prostate samples because of material loss.

The combined parasitological techniques (culture, HP, and IHC) detected active *Leishmania* infection in the genital tract of 69% ( $n = 31$ ) of males and 64% ( $n = 16$ ) of females. The frequencies of a positive parasitological result per tissue were: 64% ( $n = 16$ ) in the vagina, 58% ( $n = 26$ ) in the testes, 56% ( $n = 14$ ) in the vulva, 51% ( $n = 23$ ) in the epididymides, 32% ( $n = 8$ ) in the uterus, and 27% ( $n = 12$ ) in the prostate. In the 23 dogs (14 males and nine females) in which the parasitological tests did not detect *Leishmania* in the genital tract, *L. infantum* DNA was found in at least one of the genital samples.

The qPCR technique detected *L. infantum* DNA in at least one genital tract sample in 98% of males ( $n = 44$ ) and 96% of females ( $n = 24$ ). Four samples, including one vulva sample, two vagina samples and one prostate sample, were negative for *L. infantum* DNA. However, these four samples tested positive for *Leishmania* by the parasitological techniques. In these cases, the species *L. infantum* was identified by MLEE in the culture isolates.

Figure 2 illustrates the *L. infantum* load in the male and female genital tract. A positive correlation was observed between parasite load in the testis and epididymis ( $r = 0.80$ ,  $P < 0.001$ ) and in the vulva and vagina ( $r = 0.53$ ,  $P = 0.01$ ). There was insufficient statistical evidence to assert a difference in parasite load between the testis and epididymis ( $P = 0.665$ ), testis and vulva ( $P = 0.746$ ), testis and vagina ( $P = 0.292$ ), epididymis and vulva ( $P = 0.437$ ), epididymis and vagina ( $P = 0.484$ ), vagina and vulva ( $P = 0.162$ ), and vagina and uterus ( $P = 0.241$ ).

The *L. infantum* load in the uterus was significantly lower than that detected in the testis ( $P = 0.037$ ) and vulva ( $P = 0.008$ ). The parasite load in the prostate was significantly lower than that detected in the testis ( $P < 0.001$ ), epididymis ( $P < 0.001$ ), uterus ( $P = 0.037$ ), vulva ( $P < 0.001$ ), and vagina ( $P = 0.002$ ).

The comparison of *L. infantum* load in the male and female genital tract according to clinical classification is described in Table 1.

**Table 1** *Leishmania infantum* load in the genital tract of naturally infected dogs according to clinical classification

Tissue	<i>L. infantum</i> load <sup>a</sup>				P value
	Dogs with no or few clinical signs <sup>b</sup>		Dogs with multiple clinical signs <sup>c</sup>		
	(N = 45)		(N = 25)		
	Median	Range	Median	Range	
Testis	9.89	-0.68–16.74	10.52	-2.04–18.81	0.245
Epididymis	9.04	-1.16–15.34	10.10	0.31–14.92	0.388
Prostate	4.38	1.39–8.76	4.01	1.10–13.27	0.504
Vulva	8.82	0.5–18.4	11.07	4.73–14.84	0.343
Vagina	6.08	1.1–15.92	10.96	4.26–16.49	0.032
Uterus	4.75	0.69–13.82	6.57	3.18–14.18	0.364

Abbreviation: N, number of dogs.

<sup>a</sup>*L. infantum* load expressed as the natural logarithm of the number of genome equivalents/nanogram DNA.

<sup>b</sup>Up to three clinical signs compatible with canine visceral leishmaniasis.

<sup>c</sup>More than three clinical signs compatible with canine visceral leishmaniasis.

In the genital tract of the 47 dogs that tested positive for *Leishmania* by the parasitological methods, histological alterations were observed in at least one of the tissues examined in all 31 males (Fig. 3) and 16 females (Fig. 4). Among the 23 dogs with negative parasitological tests, 10 males and 9 females exhibited histological alterations in at least one of the tissues examined. Table 2 shows the frequencies of histological alterations in the genital tract of dogs that tested positive and negative for *Leishmania* by the parasitological methods (culture, HP or IHC) in these tissues.

**Table 2** Histological alterations in each genital tract tissue of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* according to a positive or negative result by the parasitological methods

Tissue	Histological alterations	Parasitological method for <i>Leishmania</i> <sup>a</sup>			
		Positive		Negative	
		n/total	%	n/total	%
Testis (N = 45)	Granulomatous inflammation	21/26	80.7	5/19	26.3
	Seminiferous tubule degeneration	18/26	69.2	3/19	15.7
	Seminiferous tubule atrophy	14/26	53.8	4/19	21.0
	Absence of spermatogenesis	10/26	38.4	0/19	0.0
	Fibrosis	4/26	15.3	1/19	5.2
	Non-granulomatous inflammation	2/26	7.7	0/19	0.0
	Necrosis	1/26	3.8	0/19	0.0
Epididymis (N = 45)	Granulomatous inflammation	21/23	91.3	11/22	50.0
	Non-granulomatous inflammation	2/23	8.6	2/22	9.0
Prostate (N = 45)	Non-granulomatous inflammation	8/12	66.6	10/33	30.3
	Fibrosis and glandular atrophy	6/12	50.0	2/33	6.0
	Granulomatous inflammation	1/12	8.3	1/33	3.0
Vulva (N = 25)	Granulomatous inflammation	9/14	64.2	7/11	63.6
	Non-granulomatous inflammation	5/14	35.7	1/11	9.0
	Hyperkeratosis	2/14	14.2	0/11	0.0
Vagina (N = 25)	Granulomatous inflammation	4/16	25.0	1/9	11.1
	Non-granulomatous inflammation	4/16	25.0	0/9	0.0
Uterus (N = 25)	Granulomatous inflammation	3/8	37.5	0/17	0.0
	Non-granulomatous inflammation	1/8	12.5	0/17	0.0

*Abbreviations:* N, number of samples of each genital tract tissue examined; n, number of genital tract samples with histological alterations; %, percentage.

<sup>a</sup>Parasitological method: histopathology, immunohistochemistry, and parasitological culture.

Table 3 describes the intensity of the inflammatory infiltrate according to *L. infantum* load in the genital tract organs of the dogs studied.

**Table 3** *Leishmania infantum* load according to the intensity of inflammatory infiltration in genital tract samples of naturally infected dogs

Sex	Tissue	Intensity						
		Absent or mild			Moderate to intense			<i>P</i> value
		<i>n</i>	Med	Range	<i>n</i>	Med	Range	
Male ( <i>N</i> = 45)	Testis	24	6.98	-2.04 – 13.93	21	10.86	-0.98 – 18.81	0.017
	Epididymis	16	3.13	-1.15 – 12.80	29	10.33	3.91 – 15.34	< 0.001
	Prostate	33	3.00	0.0 – 13.27	12	4.00	0.0 – 8.76	0.857
Female ( <i>N</i> = 25)	Vulva	7	10.28	4.72 – 18.39	18	8.82	0.50 – 15.81	0.275
	Vagina	20	7.44	1.09 – 15.92	5	7.30	2.59 – 16.48	0.938
	Uterus	23	4.17	0.69 – 14.17	2	9.75	5.69 – 13.81	0.186

*Abbreviations:* N, number of dogs; n, number of samples of each genital tract tissue; Med, median *L. infantum* load expressed as the natural logarithm of the number of genome equivalents/nanogram DNA.

## Discussion

The findings of the present study suggest that *L. infantum* parasitism in organs of the genital tract of dogs is not influenced by sex since a high frequency of the parasite was observed in both male and female organs. Previous studies involving dogs with parasitological confirmation of *L. infantum* have also reported a high frequency of positive results in the genital tract of males (94.7%) and females (90.0%) by IHC and qPCR [9, 12]. However, these studies evaluated male and female dogs from different endemic regions, a fact impairing the comparison of frequency between sexes and conclusions about the hypothesis of bidirectional venereal transmission in these cases [9, 12]. In another study involving dogs with parasitological confirmation that originated from the same area as the animals of the present study, the frequency of positive results in the genital tract was 90% among males and 80% among females [8]. This lower frequency compared to the present study might be due to the exclusive use of parasitological techniques, which are less sensitive than qPCR. However, other studies investigating seropositive females suggest that *L. infantum* does not exhibit tropism for the female genital tract, as the frequency of amastigote forms of this parasite and of associated inflammatory alterations was low in the genital organs [2, 11]. The different results obtained in these studies [2, 11] might be related to the small number of females studied (10 and 12, respectively), in addition to the exclusive use of a positive serological indirect fluorescence antibody test as a criterion for inclusion of the animals. The accuracy of

this test is lower than that of the combination of DPP<sup>®</sup> and ELISA [25], which were used in the present study as inclusion criteria.

The highest frequency of *L. infantum*-positive specimens was observed for the epididymis, followed by the vagina, vulva, testis, uterus and prostate, considering all diagnostic methods used in this study. There was a small difference in positive results (1 to 7%) between the testis, epididymis, vagina, and vulva. The prostate exhibited a much lower frequency of positive specimens, with the difference ranging from 18% to 32% compared to the other organs. Other authors [9] also reported similar frequencies of *L. infantum*-positive specimens in the testis (89.5%) and epididymis (84.2%) of dogs. These authors [9] observed a lower frequency of positive results in the prostate (78.9%), but higher than that found in the present study. In bitches, studies found a higher frequency of positive results in the uterus (80%), followed by the vagina (70%) and vulva (60%) [12]. These results differ from the present study in which the frequencies of positive results were much higher in the vulva and vagina compared to the uterus. The small number of males (n = 19) and females (n = 10) examined in these two previous studies [9, 12] may explain these differences in the frequency of positive specimens.

The frequency of active *L. infantum* infection was similar and high in the male and female genital tract of the animals studied here, as demonstrated by the high percentages of positive results obtained with the parasitological methods. The vagina, testes, vulva and epididymides were the tissues showing the highest frequencies of active infection with this parasite, which exceeded 50%. These results corroborate the findings of another study on dogs from the same endemic region that showed higher frequencies of active *L. infantum* infection in the vulva (70%), epididymis (55%), testis (45%), and vagina (45%) when compared to the prostate (15%) and uterus (15%) [8]. Although the uterus was the least parasitized female genital organ in this study, about 1/3 of bitches had active *L. infantum* infection in this organ. This finding suggests a high risk of vertical transmission of the parasite, a fact already confirmed in dogs [27–32]. Vertical transmission of CVL is the main route of transmission in areas without demonstration of vector transmission, such as the United States, and may contribute to the maintenance of visceral leishmaniasis in endemic areas [14, 31, 32]. The lower frequency of active *L. infantum* infection and the fact that the blood-prostate barrier seems to restrict the passage of leukocytes from the interstitium to the ductal fluid during prostatitis [33] suggest a minor role of this organ in the contamination of dog semen with *L. infantum* when compared to the testes and epididymides.

The four tissues with the highest *L. infantum* load, i.e., testis, epididymis, vulva and vagina, also exhibited the highest frequencies of positive results but no significant difference was observed between these organs. The lowest parasite load was found in the prostate and uterus, in agreement with the finding of the lowest frequency of positive results. Other authors also detected a higher parasite load by qPCR in testis and epididymis, although there was no statistically significant difference compared to parasite load in the prostate [9]. In contrast to our study, in females, the *L. infantum* load detected by qPCR in the vulva and vagina was similar to that of the uterus [12]. Studies evaluating parasite loads by IHC also detected higher loads in the testis, epididymis, vulva and vagina [1, 8]. The positive correlation between parasite load in the testis and epididymis and in the vulva and vagina observed in the present study can be explained by the anatomic proximity and communication between these organs [34, 35].

According to some authors [1, 11, 15], venereal transmission of *L. infantum* in dogs tends to be unidirectional, from male to female, due to the exclusive tropism of *L. infantum* for the male genital tract. However, the present findings of similar parasite load and high frequency of active *L. infantum* infection in the male and female genital tract reinforce the possibility of bidirectional venereal transmission. This type of transmission that can occur from male to female or from female to male has been suggested in other studies based on the high frequency of *L. infantum* in the genital tract of both sexes [8, 12]. Furthermore, the isolation of *L. infantum* from semen and seminal fluid as well as from vaginal secretion also supports the possibility of bidirectional transmission [8, 14, 36]. In bidirectional venereal transmission, infection would first occur in the male and female external genital organs during copulation. In males, the infection would first ascend from the penis to the testes and epididymides and then to the prostate. The fact that the prostate was the genital organ least affected by *L. infantum* in this study and in others [3, 8, 10], as well as the high frequency of this parasite in the prepuce and glans [8-10], supports this hypothesis. In females, the infection would ascend from the vulva and vagina to the uterus, ovary and uterine tubes, a fact that explains the lower frequency and parasite load in these last three organs observed in this and in another study [8] when compared to the external genital organs. According to a previously reported hypothesis, venereal transmission of *L. infantum* from male to female would occur by transfer of amastigote forms present in the glans, prepuce and semen through frequent traumatic wounds in the external genitalia that occur during copulation in dogs [1, 2, 8, 37]. On the other hand, Magro et al. [14], who detected *L. infantum* DNA in vaginal secretions of bitches, suggested that venereal transmission of this parasite from female to

male is the result of the sexual behavior of males that sniff and lick the vulva and thus come in contact with positive vaginal secretions, as well as the contact of the penis with these secretions during copulation. In addition to venereal transmission, the exposure of the skin of male and female external genitalia to the bites of infected sandflies can cause infection with *L. infantum*. After infection, the parasite can spread through the blood or lymphatic system to other organs of the genital tract. The high frequencies of positive results in vulvar skin observed in this study and in vulvar skin and prepuce reported in other studies [1, 8–10] support that this route of infection of the genital tract may occur.

In the present study, the parasite load was significantly higher in the vagina of females with multiple clinical signs of CVL compared to those without or with few clinical signs. Although no association of clinical signs with parasite load was observed in the other tissues of the genital tract, all except for the prostate exhibited a higher *L. infantum* load in dogs with multiple clinical signs of CVL. Other authors found a significantly higher *L. infantum* load in the testis, epididymis, glans and prepuce of dogs with clinical signs of CVL compared to those without signs of the disease [10]. Thus, the results of that study [10] and the present findings suggest that, among both males and females, the potential of venereal transmission is higher in animals with clinical signs compatible with CVL.

The frequency of inflammatory reaction was much higher in tissues that tested positive by the parasitological methods compared to those in which no parasites were detected by these tests. Additionally, granulomatous inflammation, which is expected as a response to the infection of different organs with *L. infantum* in dogs [38], predominated in all organs, except for the prostate. These results indicate that the histological alterations were associated with active *L. infantum* infection. The predominance of a non-granulomatous inflammatory reaction in the prostate, as also observed in other studies involving dogs with CVL [7, 9], might be explained by the lower parasite load and lower frequency of *L. infantum*-positive specimens compared to the other organs examined. Other causes of non-granulomatous prostatitis may have also influenced the predominance of this type of inflammatory reaction, such as bacterial infections with *Escherichia coli* or urinary reflux [39]. In the testes, inflammation associated with *L. infantum* infection was the likely cause of degeneration and atrophy of the seminiferous tubules, fibrosis, necrosis and absence of spermatogenesis, in agreement with other studies [1, 5, 8]. These alterations, together with the prostatitis accompanied by fibrosis and glandular atrophy observed in this study, can compromise sperm quality and cause infertility of dogs with CVL [7]. Except for the vulva and vagina, inflammation was more intense in genital tract organs with a higher parasite load, although a



significant association was only found for the testis and epididymis. In the vulva and vagina, the result may have been influenced by the small number of animals in the groups with an absent or mild inflammatory reaction in the vulva and moderate to intense reaction in the vagina. These results suggest that the intensity of inflammation in the genital tract of dogs is associated with *L. infantum* load, in agreement with other authors [1, 10].

### **Conclusions**

The high frequency, presence of active infection and similar *L. infantum* loads in the testes, epididymides, vulva and vagina of naturally infected dogs suggest that both males and females are capable of venereal transmission of the parasite. In addition to venereal transmission, vertical transmission might be frequent in the canine population from the area studied since viable forms of *L. infantum* were commonly observed in the uterus. The castration of dogs would therefore be an important control measure of CVL in endemic areas.

### **Abbreviations**

CVL: canine visceral leishmaniasis; DPP: dual-path platform; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; gEq/ng: genome equivalents/nanogram; HP: histopathology; IHC: immunohistochemistry; MLEE: multilocus enzyme electrophoresis; qPCR: quantitative polymerase chain reaction.

### **Acknowledgements**

We thank the Municipal Health Department of Barra Mansa and the Central Laboratory of Public Health (LACEN) for their collaboration; Adilson Benedito de Almeida, Monique Paiva Campos and Antonio Carlos da Silva from INI, Fiocruz, for technical assistance, and Ricardo Baptista Schmidt from the Oswaldo Cruz Institute (IOC), Fiocruz, for processing the figures.

### **Authors' contributions**

VCB, RCM and RVCO conceived and designed the study. VCB, RCM, AAVMJ, LFCM, LCF, FCCR, SAS, RTF and RVB performed the experiments. VCB, RCM and RVCO analyzed the data. VCB, RCM, SAP, RVCO, FBF and FNM wrote the manuscript. RCM, FBF and SAP secured funding and resources. RCM supervised the study. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding**

This study was supported by the state funding agency Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Grants: CNE E-26/203.069/2016 and TCT E-26/202.561/2017) and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil (Finance Code 001). SAP, FBF and RCM are recipients of productivity fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Availability of data and materials**

Data supporting the conclusions of this article are included within the article.

**Ethics approval and consent to participate**

This study was carried out in strict accordance with the recommendations of the Brazilian Ministry of Health and the Federal Council on Veterinary Medicine, with permission of the owners. The study protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Oswaldo Cruz Foundation (CEUA/FIOCRUZ; Permit Number: LW-54/13).

**Consent for publication**

Not applicable.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interest.

**Author details**

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil. <sup>2</sup> Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil. <sup>3</sup> Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, 3775, Curitiba, Paraná, Brazil. <sup>4</sup>Serviço de Anatomia Patológica, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil. <sup>5</sup>Laboratório de Epidemiologia Clínica, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas,

Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4036, Rio de Janeiro, RJ 21040-361, Brazil.  
<sup>6</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil. <sup>7</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM)/CNPq, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.  
<sup>8</sup>Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil.

## References

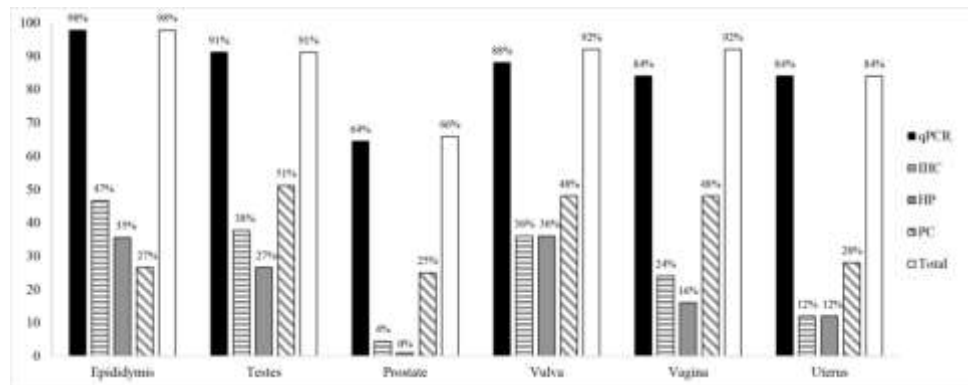
1. Diniz SA, Melo MS, Borges AM, Bueno R, Reis BP, Tafuri WL, et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet Pathol.* 2005;42:650-8.
2. Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009;160:55-9.
3. Benites AP, Fernandes CE, Brum KB, et al. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. *Pesq Vet Bras.* 2011;31:72-7.
4. Vida B, Toepp A, Schaut RG, Esch KJ, Juelsgaard R, Shimak RM, et al. Immunologic progression of canine leishmaniosis following vertical transmission in United States dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016;169:34-8.
5. Amara A, Mrad I, Melki MK, Mrad MB, Rejeb A. Etude histologique des lésions testiculaires chez les chiens leishmaniens. *Revue Méd Vét.* 2009;160: 54-60.
6. Manna L, Paciello O, Morte RD, Gravino AE. Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. *Parasit Vectors.* 2012;5:216.
7. Mir F, Fontaine E, Reyes-Gomez E, Carlus M. Subclinical leishmaniasis associated with infertility and chronic prostatitis in a dog. *Fontbonne A. J Small Anim Pract.* 2012;53:419-22.
8. Boechat VC, Mendes Junior AAV, Madeira MF, Ferreira LC, Figueiredo FB, Rodrigues FD, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. *Parasitol Res.* 2016;115:2371-9.
9. Oliveira VVG, Macedo SRB, Araújo FR, Ramos CAN, Ramos RAN, Maia FCL, et al. Histopathological evaluation and parasite quantification (qPCR) in the male dog's genital system after natural infection with *Leishmania infantum*. *Cienc Rural.* 2016a;46:641-47.

10. Carvalho Junior CG, Teixeira Neto RG, Lopes VV, Belo VS, Alves NR, Paula TB, et al. Parasitism and inflammation in ear skin and in genital tissues of symptomatic and asymptomatic male dogs with visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2017;116:987-995.
11. Silva FL, Rodrigues AA, Rego IO, Santos RL, Oliveira RG, Silva TM, et al. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol.* 2008;151:86-90.
12. Oliveira VVG, Macedo SRB, Araújo FR, Ramos CAN, Ramos RAN, Maia FCL, et al. Correlation between chronic inflammation, immunostaining and parasite load in the genital system of female dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Cienc Rural.* 2016b;6:2029-35.
13. Latrofa MS, Dantas-Torres F, Caprariis D, Cantacessi C, Capelli G, Lia RP, et al. Vertical transmission of *Anaplasma platys* and *Leishmania infantum* in dogs during the first half of gestation. *Parasit Vectors.* 2016;9:269.
14. Magro AG, Assis VP, Silva LC, Tafuri WL, Silva SO, Melo MN, Valle GR, et al. *Leishmania infantum* is present in vaginal secretions of naturally infected bitches at lower levels in oestrogenized bitches than in non-oestrogenized bitches. *Acta Parasitol.* 2017;62:625-29.
15. Turchetti AP, Souza TD, Paixão TA, Santos RL. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8:403-407.
16. Mello CX, Mendes Junior AAV, Furtado MC, Miranda LFC, Madeira MF. Outbreak of canine visceral leishmaniasis in Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47:1-3.
17. Pimentel MIF, Alves ELM, Silva MHFF, Moza PG, Almeida PMP, Cunha CS, et al. High visceral leishmaniasis mortality rate in Barra Mansa, a new area of visceral leishmaniasis transmission in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47:521-23.
18. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 2006. [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_viseral.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viseral.pdf). Accessed 16 April 2015.
19. Alvar J, Molina R, San Andres M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, et al. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol.* 1994;88: 371–8.

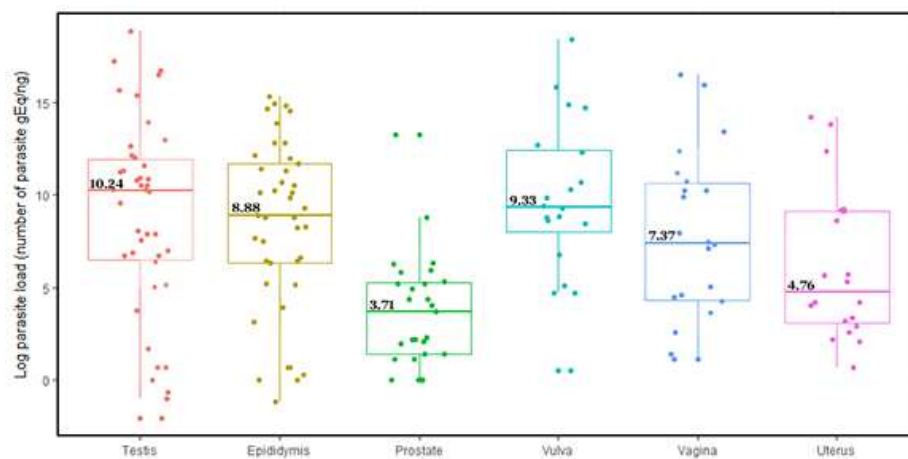
20. Souza CC, Barreto TO, Da Silva SM, Pinto AWJ, Figueiredo MM, Rocha OGF, et al. A potential link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis. *Int J Exp Path.* 2014;95: 260-70.
21. Carson FL, Cappellano CH. *Histotechnology: a self-instructional text.* 4th ed. Chicago: ASCP Press; 2015.
22. Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AGS, Nascimento LD, Furtado M, Mouta-Confort E, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res Vet Sci.* 2009;87: 260-2.
23. Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;50: 296-311.
24. Oliveira VDC, Boechat VC, Mendes Junior AAV, Madeira MF, Ferreira LC, Figueiredo FB, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. *PLoS One.* 2017;12:e0175588.
25. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018. <https://www.R-project.org/>. Accessed 20 Out 2018.
26. Coura-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Reis LE, et al. 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.* 2011;5:e1291.
27. Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol.* 2005;91:970-2.
28. Da Silva SM, Ribeiro VM, Ribeiro RR, Tafuri WL, Melo MN, Michalick MS. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Vet Parasitol.* 2009;166:159-62.
29. Pangrazio KK, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TM, Paixao TA, et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet Parasitol.* 2009; 165:327-31.
30. Ben Slimane T, Chouihi E, Ben Hadj Ahmed S, Chelbi I, Barhoumi W, Cherni S, et al. An investigation on vertical transmission of *Leishmania infantum* in experimentally infected

- dogs and assessment of offspring's infectiousness potential by xenodiagnosis. *Vet Parasitol.* 2014; 206:282-6.
31. Toepp AJ, Schaut RG, Scott BD, Mathur D, Berens AJ, Petersen CA. *Leishmania* incidence and prevalence in U.S. hunting hounds maintained via vertical transmission. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 2017;10: 75–81.
  32. Toepp AJ, Bennett C, Scott B, Senesac R, Oleson JJ, Petersen CA. Maternal *Leishmania infantum* infection status has significant impact on leishmaniasis in offspring. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13: e0007058.
  33. Brant RF; Turner TT. A blood-prostate barrier restricts cell and molecular movement across the rat ventral prostate epithelium. *J Urol.* 2000;163:1591-94.
  34. Feldman EC, Nelson RW. Canine and feline endocrinology and reproduction. 3th. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co.; 2004.
  35. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. Pathology of domestic animals. 5th. ed. New York: Academic Press; 2007.
  36. Riera C, Valladares JE. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitol Today.* 1996;12:412.
  37. Foster RA. Male reproductive system. In: Zachary JF, McGavin MD, editors. *Pathologic Basis of Veterinary Disease.* 6th ed. Illinois: Elsevier; 2017. p. 1132-34.
  38. Koutinas AF, Koutinas CK. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet Pathol.* 2014;51:527-38.
  39. Barsanti JA. Genitourinary Infections. In: Greene CE, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* 4th ed. St Louis: Elsevier/Saunders; 2012. p. 1031-32.

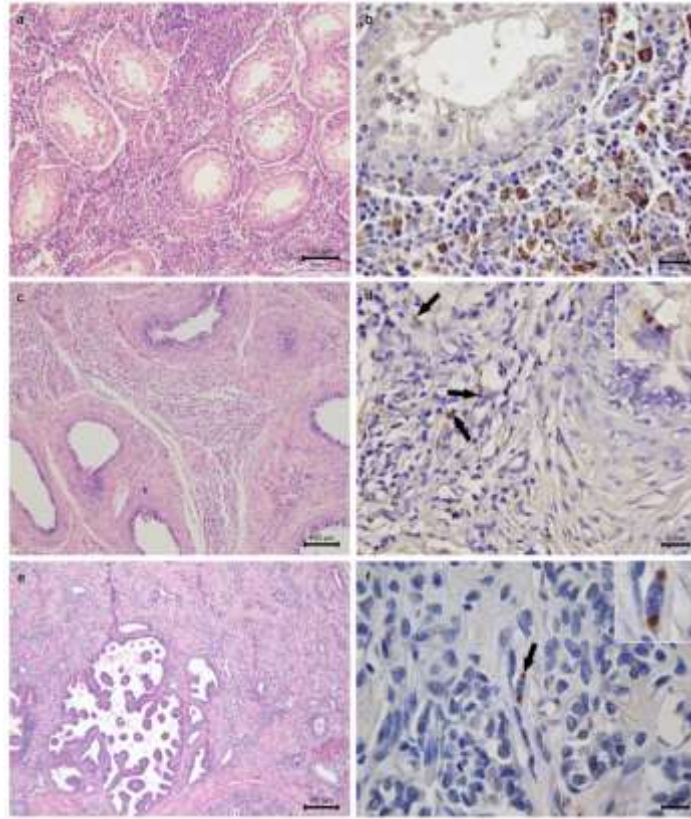
## Figure captions



**Fig. 1** Frequency of a positive *Leishmania* result in genital tract samples of 45 male and 25 female dogs naturally infected with *L. infantum* detected by quantitative PCR (qPCR), histopathology (HP), immunohistochemistry (IHC), and parasitological culture (PC). The percentage in each female and male organ was calculated in relation to the total number of females and males. Total: positive result in at least one of the diagnostic assays.

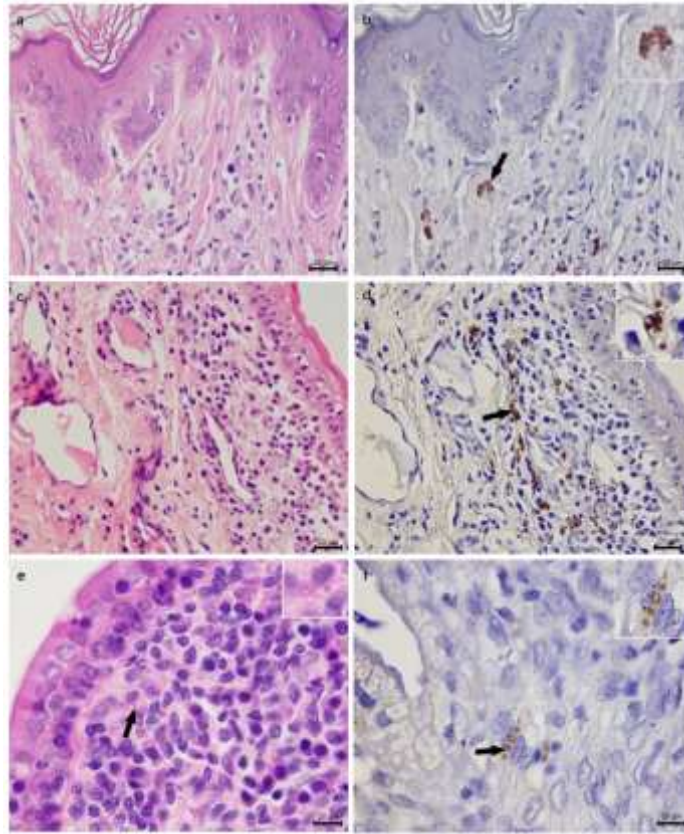


**Fig. 2** *Leishmania infantum* load expressed as the natural logarithm of the number of genome equivalents/nanogram DNA (gEq/ng) in testis, epididymis, prostate, vulva, vagina, and uterus of naturally infected dogs. The colored horizontal lines indicate the median parasite load. The vertical lines indicate the interquartile range. Colored dots represent the parasite load of each dog.



**Fig. 3** Histological findings in the genital tract of male dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **a** Marked diffuse granulomatous interstitial orchitis. **b** Many brown-stained *Leishmania* amastigotes in the cytoplasm of macrophages in testicular interstitial tissue. **c** Marked diffuse granulomatous interstitial epididymitis. **d** Brown-stained *Leishmania* amastigotes in the cytoplasm of macrophages (arrows and inset) in the epididymis. **e** Prostate showing marked diffuse granulomatous inflammation, fibrosis, and glandular atrophy. **f** Brown-stained *Leishmania* amastigotes in the cytoplasm of macrophages (arrow and inset) in the prostate. Hematoxylin-eosin staining (**a,c,e**); immunohistochemistry (**b,d,f**).





**Fig. 4** Histological findings in the genital tract of female dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **a** Moderate diffuse granulomatous vulvitis in the dermis and acanthosis and hyperkeratosis in the epidermis. **b** Brown-stained *Leishmania* amastigotes in the cytoplasm of macrophages (arrow and inset) in the vulva. **c** Marked diffuse granulomatous vaginitis in the lamina propria. **d** Several brown-stained *Leishmania* amastigotes in the cytoplasm of macrophages (arrow and inset) in the vagina. **e** Marked diffuse granulomatous endometritis in the lamina propria with an amastigote form of *Leishmania* (arrow and inset) in the cytoplasm of macrophages. **f** Brown-stained *Leishmania* amastigotes in the cytoplasm of macrophages (arrow and inset) in the uterus. Hematoxylin-eosin staining (**a,c,e**); immunohistochemistry (**b,d,f**).

## APÊNDICE B

### Artigo 2

O artigo foi submetido à *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*.

#### **Anticorpos anti-*Brucella canis* em cães infectados naturalmente por *Leishmania infantum* e alterações histopatológicas associadas no trato genital**

Viviane Cardoso Boechat<sup>[1]</sup>, Sandro Antonio Pereira<sup>[1]</sup>, Artur Augusto Velho Mendes Júnior<sup>[1]</sup>, Vanessa Cristina Pelícia<sup>[2]</sup>, Jane Megid<sup>[2]</sup>, Maurício Gauterio Dasso<sup>[3]</sup>, **Rogério Oliveira Rodrigues<sup>[3]</sup>**, Luciana de Freitas Campos Miranda<sup>[1]</sup>, Fabiano Borges Figueiredo<sup>[4]</sup>, Luiz Claudio Ferreira<sup>[1]</sup>, Rayane Teles-de-Freitas<sup>[5]</sup>, Rafaela Vieira Bruno<sup>[5] [6]</sup>, Rodrigo Caldas Menezes<sup>[1]\*</sup>

[1]. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

[2]. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP, Brazil.

[3]. Laboratório de Brucelose, **Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, Eldorado do Sul, RS, Brazil.

[4]. Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba, PR, Brazil.

[5]. Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

[6]. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM)/CNPq, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**Corresponding author:** Rodrigo Caldas Menezes

**e-mail:** rodrigo.menezes@ini.fiocruz.br

**Orcid:** 0000-0003-1853-3449

**Anticorpos anti-*Brucella canis* em cães infectados naturalmente por *Leishmania infantum* e alterações histopatológicas associadas no trato genital**

**Running title:** *B. canis* and *L. infantum* in dogs

**Abstract**

**Introduction:** Na leishmaniose visceral canina, coinfeções podem agravar a doença. Nosso objetivo foi investigar *Brucella canis* em cães infectados por *Leishmania infantum*. **Methods:** sorologia para *B. canis*, PCR para *B. canis* e *L. infantum* e histopatologia no trato genital foram realizados em 106 cães soropositivos para *L. infantum*. **Results:** Anticorpos anti- *B. canis* foram detectados em sete cães, cujos sinais clínicos, carga de *L. infantum* e alterações histológicas foram semelhantes à dos soronegativos para essa bactéria. **Conclusions:** A circulação de anticorpos anti-*B. canis* foi baixa, porém demonstra exposição de cães a essa bactéria em área endêmica de leishmaniose visceral.

**Keywords:** Brucelose canina. Leishmaniose visceral canina. Sorologia. PCR. Histopatologia.

A bactéria *Brucella canis* é zoonótica, principal causadora da brucelose canina, com distribuição mundial e predileção por tecidos produtores de esteroides como os testículos, epidídimos, próstata e útero<sup>1</sup>. A forma mais comum de transmissão é a venérea, podendo gerar aborto tardio em fêmeas, bem como epididimite, atrofia testicular, orquite e dermatite úmida escrotal nos machos<sup>1,2</sup>. Nos humanos, pode gerar febre recorrente, cefaleia, fraqueza, mal-estar, e até manifestações mais graves como endocardite, aborto e osteomielite<sup>2</sup>.

O protozoário *Leishmania infantum* é causador da leishmaniose visceral canina (LVC), uma zoonose de distribuição mundial, tendo o cão como reservatório principal na área urbana<sup>3</sup>. Apesar da clássica transmissão do parasito para humanos, cães e outros hospedeiros mamíferos pela picada de flebotomíneos infectados do gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo), a transmissão por via venérea e vertical entre cães já foi relatada<sup>4,5</sup>. A infecção por *L. infantum* pode gerar lesões genitais como orquite, epididimite, prostatite, dermatite vulvar, vaginite e endometrite, que também são observadas na brucelose canina, ressaltando a importância da inclusão dessa bacteriose no diagnóstico diferencial da LVC<sup>1,6</sup>.

A imunossupressão causada pela *L. infantum* em cães<sup>7</sup> pode agravar o quadro clínico ou gerar enfraquecimento da defesa contra novos patógenos, proporcionando o aparecimento das coinfeções<sup>8</sup>. As coinfeções de agentes bacterianos e parasitários com *L. infantum* são descritas, podendo gerar progressão e aumento da mortalidade por LVC<sup>9,10</sup>.

Em humanos já foi relatado coinfeção entre *L. infantum* e *Brucella* spp. no Irã<sup>11</sup>. Entretanto, faltam estudos sobre a circulação de *B. canis* e alterações clínicas e histológicas associadas em cães, bem como sua presença em cães infectados por *L. infantum* e lesões associadas nos órgãos genitais. Portanto, os objetivos desse estudo foram verificar a presença de *B. canis* em cães infectados naturalmente por *L. infantum* e os sinais clínicos observados, bem como as alterações histológicas e a carga de *L. infantum* no trato genital. The procedures of this study were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA/FIOCRUZ), Permit No LW-54/13 e LW-24/17.

Cento e seis cães domiciliados (63 machos e 43 fêmeas) foram incluídos entre janeiro de 2013 e dezembro de 2016, provenientes do município de Barra Mansa (22°32'25,19"S e 44°10'35,33"O), estado do Rio de Janeiro, Brasil, área endêmica de LVC. Os cães incluídos eram soropositivos para anticorpos anti-*L. infantum* no teste rápido de imunocromatografia de duplo percurso (DPP) e no ensaio imunoenzimático (ELISA), ambos produzidos por BioManguinhos (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil). Os cães foram encaminhados para eutanásia como medida de controle preconizada pelo Ministério da Saúde<sup>3</sup>. Após contenção mecânica,

os cães foram avaliados clinicamente por meio de inspeção de pele e de mucosas oral e ocular, palpação de linfonodos superficiais e órgãos abdominais. Foram considerados sinais clínicos de LVC: magreza ou caquexia, alopecia geral ou localizada, lesões cutâneas como úlceras e descamação, ceratoconjuntivite, onicogribose, linfadenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia e mucosas ocular ou oral hipocoradas.

A seguir, os cães foram submetidos à coleta de sangue por meio da punção da veia cefálica e o soro obtido foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para realização da técnica de imunodifusão em gel de agarose (IDGA), visando a detecção de anticorpos anti-*B. canis*. Em seguida, os cães foram sedados com cloridrato de quetamina (10 mg/kg) associado a maleato de acepromazina (0,2 mg/kg), por via intramuscular e submetidos à eutanásia com dose excessiva de tiopental sódico e cloreto de potássio por via endovenosa. Na necropsia, foram coletadas amostras de tecido do trato genital masculino (epidídimos direito e esquerdo, testículos direito e esquerdo e próstata) e feminino (vulva, vagina e corpo do útero). Foram coletados três fragmentos de cada tecido: um mergulhado em solução salina estéril e submetido à cultura parasitológica (PC) para detecção de *Leishmania*; um armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior submissão à reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) para detecção de DNA de *L. infantum* e de *Brucella* spp.; e o outro, fixado em formalina tamponada a 10% e emblocado em parafina (FFPE) para realização das técnicas de imunohistoquímica (IHC) e histopatologia (HP) para diagnóstico de *Leishmania* spp. As técnicas de qPCR para detecção de DNA de *L. infantum* e *B. canis* foram realizadas em amostras do trato genital de 74 dos 106 cães incluídos no estudo, sendo que em 70 foram examinadas amostras congeladas e em 4 amostras FFPE.

A técnica de IDGA foi realizada utilizando antígeno de lipopolissacarídeos e proteínas solúveis extraídos da bactéria *B. ovis*, amostra Reo 198 (TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná, Curitiba, PR, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante.

Para detecção de DNA de *Brucella* spp. no trato genital, inicialmente foi realizada a extração de DNA, utilizando o kit DNeasy® Blood & Tissue (Quiagen®, Hilden, Alemanha) numa plataforma semi-automática Qiacube (Quiagen®, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de DNA obtidas foram amplificadas na plataforma StepOne™ (Applied Biosystems®) e o par de *primers* utilizado foi ITS66 (ACATAGATCGCAGGCCAGTCA) e ITS279 (AGATACCGACGCAAACGCTAC), específicos para *Brucella* spp., sendo cada amostra testada em duplicata de acordo com protocolo previamente descrito<sup>12</sup>.

As técnicas PC, HP (coloração hematoxilina-eosina) e IHC para diagnóstico de *Leishmania* spp. e qPCR para detecção de DNA de *L. infantum* e quantificação de sua carga foram realizadas de acordo com protocolos previamente descritos<sup>9,13</sup>.

Na histopatologia, o infiltrado inflamatório nos tecidos foi classificado de acordo com estudo anterior<sup>9</sup> em granulomatoso ou não-granulomatoso. A intensidade do infiltrado inflamatório foi classificada em: ausente ou leve (infiltrado celular ausente ou em pequenos focos e dispersos) e moderado a intenso (infiltrado celular denso e difuso).

Anticorpos anti-*B. canis* foram detectados em sete (6,6%) dos 106 cães examinados, todos adultos jovens, cinco machos e duas fêmeas, seis com sinais clínicos compatíveis com LVC e com reação inflamatória nos tecidos do trato genital (Tabela 1). As principais alterações histológicas observadas no trato genital dos cães soropositivos para *B. canis* encontram-se na Tabela 1 e Figura 1. Dos sete cães soropositivos para *B. canis*, 3 pertenciam ao grupo de 74 cães examinados pela técnica de qPCR para detecção de DNA de *Brucella* spp. e *L. infantum* nos órgãos do trato genital. Desses 74 cães, todos foram negativos para *Brucella* spp. pela técnica de qPCR.

No grupo dos 74 cães examinados pela técnica de qPCR para detecção de DNA de *Brucella* spp. e *L. infantum*, 67 cães (43 machos e 24 fêmeas) foram negativos para anticorpos anti-*B. canis*. Nesses 67 cães, as medianas da carga de *L. infantum* expressas em logaritmo natural do número de equivalentes genômicos (gEq)/ng nos órgãos do trato genital foram: 10,24 (-2,04 a 18,81) nos testículos, 8,88 (-1,16 a 15,34) no epidídimo, 4,19 (1,1 a 8,76) na próstata, 10,28 (0,5 a 18,4) na vulva, 7,3 (1,1 a 16,49) na vagina e 4,17 (0,69 a 14,18) no útero. Considerando todos os cães negativos para anticorpos anti-*B. canis* nesse estudo (n=99, 58 machos e 41 fêmeas), 89 (90%) possuíam sinais clínicos compatíveis com LVC. Os principais sinais clínicos foram: linfadenomegalia (n=47, 53%), alopecia (n=41, 46%), onicogribose (n=40, 45%), esplenomegalia (n=35, 39%), descamação da pele (n=34, 38%), caquexia (n=12, 13%), magreza (n= 12, 13%), ceratoconjuntivite (n=11, 12%) e palidez das mucosas (n=4, 4%). No trato genital, um total de 92 (93%) desses 99 cães, 54 machos e 38 fêmeas, foram positivos para *Leishmania* por pelo menos uma técnica de diagnóstico usada. Na histopatologia, um infiltrado inflamatório granulomatoso predominou em todos os órgãos do trato genital estudados, exceto para próstata e útero.

A circulação de anticorpos anti-*B. canis* foi baixa, semelhante à maioria dos estudos realizados em cães nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Paraíba, Bahia, Rondônia, Alagoas e Rio Grande do Sul, Brasil, nos quais as frequências de soropositividade variaram entre 0,8 a 14%<sup>2</sup>. Em contraste, poucos estudos encontraram frequências de

soropositividades superiores a 20%, como as relatadas no município de Araguaína-TO (44,6%), Natal-RN (28,9%) e nos municípios de Niterói-RJ e Rio de Janeiro-RJ (25,7%)<sup>2</sup>. Essa variação de frequência de soropositividade para *Brucella* pode estar relacionada à região geográfica e ao tipo de teste de diagnóstico empregado nesses estudos: IDGA, teste de aglutinação rápida em placa com e sem 2-mercaptoetanol e teste de aglutinação em tubo.

Em estudo comparativo sobre técnicas de diagnóstico de brucelose canina, a PCR de amostras de sangue e trato genital apresentou sensibilidade significativamente maior do que a de IDGA<sup>14</sup>. Essa última técnica apresentou sensibilidade de 52,9%, especificidade de 100% e positividade associada à bacteremia<sup>14</sup>. Baseado nessas características das técnicas de IDGA e PCR, a negatividade para *Brucella* spp. pela técnica de qPCR no trato genital dos cães soropositivos para essa bactéria no presente estudo não era esperada. Uma possível explicação para esse resultado seria a exposição dos cães a *B. canis* com resolução da infecção, havendo a persistência de anticorpos no sangue. Adicionalmente, poderia haver infecção ativa por essa bactéria em outros tecidos diferentes dos examinados, tais como, como baço, linfonodos e disco intervertebral, que são sítios comuns de infecção por *B. canis* em cães<sup>1</sup>. Outra hipótese é que os resultados da IDGA no presente trabalho sejam falso-positivos, pois essa técnica utiliza antígenos de membrana, que podem ter reação cruzada com outras bactérias<sup>14</sup>. Há outro teste de IDGA, empregando antígenos intracitoplasmáticos da *B. canis*, que é um método muito específico. Entretanto, esse teste pode apresentar baixa sensibilidade com uma proporção significativa de resultados falso negativos, principalmente em infecções recentes<sup>14</sup> e não está disponível comercialmente no Brasil. Porém, mesmo com as limitações, o IDGA com antígenos de membrana é um teste sorológico aceito internacionalmente<sup>14</sup> e disponível no Brasil para diagnóstico sorológico da brucelose canina. É um teste útil, uma vez que a cultura microbiológica, teste padrão-ouro, necessita de laboratórios de nível 3 de biossegurança, o que muitas vezes torna inviável o diagnóstico.

A inflamação granulomatosa observada no trato genital é compatível com infecções por *L. infantum* e *B. canis*<sup>1,2,6</sup>. Porém, a negatividade na qPCR para *Brucella* e a detecção de *L. infantum* no trato genital de seis dos sete cães soropositivos para *Brucella* spp., sugerem que a inflamação granulomatosa esteve associada à infecção por *L. infantum*. Adicionalmente, parece não ter havido influência da soropositividade para *Brucella* spp. com relação à frequência e tipos de sinais clínicos e carga de *L. infantum*, uma vez que esses resultados foram semelhantes aos dos cães sem anticorpos anti-*B. canis*. Entretanto, a participação da *Brucella* não deve ser excluída totalmente, uma vez que a carga parasitária da próstata de um dos cães soropositivos para *Brucella* spp. foi maior do que a encontrada na próstata dos cães

infectados somente por *L. infantum*. Nesse cão, a prostatite linfoplasmocitária acompanhada de fibrose e atrofia das glândulas compõe um espectro de alterações histológicas muito incriminadas na infecção por *B. canis*<sup>2</sup>. Dessa forma, há a possibilidade de que pelo menos nesse cão soropositivo para *B. canis* a carga de *L. infantum* pode ter sido influenciada pela coinfeção com essa bactéria, ressaltando a importância de se considerar a brucelose canina no diagnóstico diferencial da LVC no trato genital.

Como conclusão, a baixa ocorrência de anticorpos anti-*B. canis* e a não detecção de DNA dessa bactéria na população canina estudada, sugerem que a infecção por *L. infantum* parece não aumentar a susceptibilidade à infecção por *B. canis*. Entretanto, a soropositividade para *B. canis* demonstra exposição de cães a essa bactéria em área endêmica de leishmaniose visceral e alerta para inclusão da brucelose canina no diagnóstico diferencial da LVC.

### **Acknowledgments**

We thank the Municipal Health Department of Barra Mansa and the Central Laboratory of Public Health (LACEN) for their collaboration, Adilson Benedito de Almeida, Antonio Carlos da Silva, Francisco das Chagas de Carvalho Rodrigues, Shanna Araujo dos Santos and Monique Paiva de Campos from INI, Fiocruz, and Acácia Ferreira Vicente from FMVZ, UNESP, for technical assistance, Ricardo Baptista Schmidt from IOC, Fiocruz, for processing the figures.

### **Conflicts of interest**

The authors declare that there is no conflict of interest.

### **Financial support**

This study was supported by the state funding agency FAPERJ (Grants: E-26/203.069/2016 and E-26/202.561/2017) and CAPES (Finance code: 001), Brazil. FBF, RCM and SAP are recipient of productivity fellowships from CNPq, Brazil. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

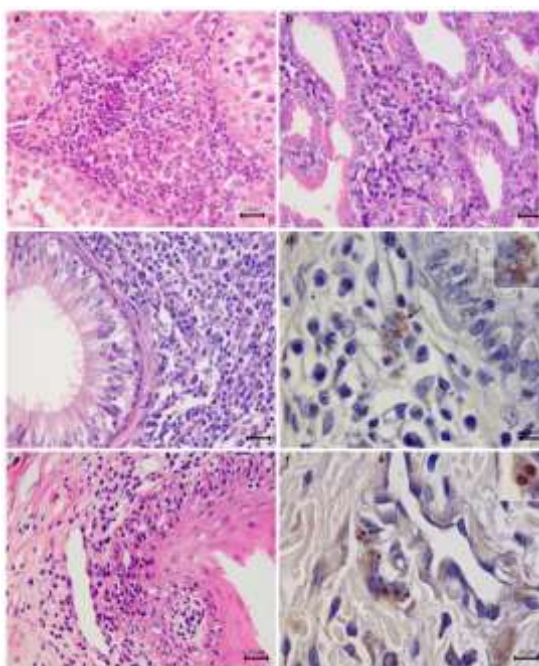


## REFERENCES

1. Makloski CL. Canine brucellosis management. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2011; 41(6):1209-19.
2. Rodrigues FS, Souza GV, Magalhães ILA, Colares RR, Santiago SLT. Brucelose canina: revisão de literatura. *Rev Bras Hig Sanid Anim.* 2016;10(4):870-888.
3. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde. 2006. Acesso em 16 abr 2015 Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceras.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceras.pdf).
4. Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009;160:55-9.
5. Vida B, Toepp A, Schaut RG, Esch KJ, Juelsgaard R, Shimak RM, et al. Immunologic progression of canine leishmaniosis following vertical transmission in United States dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016;169:34-8.
6. Boechat VC, Mendes Junior AAV, Madeira MF, Ferreira LC, Figueiredo FB, Rodrigues FD, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. *Parasitol Res.* 2016;115:2371-9.
7. Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenbergh J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994;62:229-35.
8. Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol.* 2009;20(5-6):471-489.
9. Oliveira VDC, Boechat VC, Mendes Junior AAV, Madeira MF, Ferreira LC, Figueiredo FB, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. *PLoS One.* 2017;12:e0175588.
10. Toepp AJ, Monteiro GRG, Coutinho JFV, Lima AL, Larson M, Wilson G, et al. Comorbid infections induce progression of visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2019;12(1):54.
11. Fakhar M, Banimustafavi E, Motazedian MH, Asgari Q. Co-infection of *Leishmania infantum* and *Brucella* spp. in Iran. *Com Clin Pathol.* 2009;18:91-4.

12. Keid LB, Soares RM, Vieira NR, Megid J, Salgado VR, Vasconcellos SA, et al. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. *Vet Res Commun.* 2007;31:951-65.
13. Campos MP, Madeira MF, Silva DA, Solcà MS, Espíndola OM, Mendes Júnior AAV, et al. Accuracy of quantitative polymerase chain reaction in samples of frozen and paraffin embedded healthy skin for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2017; 69(6):1443-50.
14. Keid LB, Soares RM, Vasconcellos SA, Megid J, Salgado VR, Richtzenhain LJ. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. *Res Vet Sci.* 2009;86(1):22-6.

### Figure Legends



**Figura 1.** Cães soropositivos para anticorpos anti- *B. canis* e infectados por *L. infantum*. **A:** Macho #1. Orquite intersticial granulomatosa, moderada a intensa. **B a D:** Macho# 2. **B:** Prostatite linfo-plasmocitária discreta. **C:** Epididimite granulomatosa, moderada a intensa. **D:** Formas amastigotas de *Leishmania* marcadas em castanho no citoplasma de macrófagos (seta e detalhe) no epidídimo. **E a F:** Fêmea#6. **E:** Vaginite leve na lâmina própria e perivascular, com infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, linfócitos e neutrófilos. **F:** Formas amastigotas de *Leishmania* marcadas em castanho no citoplasma de macrófagos (seta e detalhe) na vulva. Coloração hematoxilina-eosina (A, B, C, E). Imuno-histoquímica (D, F).

Tabela 1- Descrição de sexo, raça e idade, sinais clínicos, alterações histológicas, positividade e carga de *L. infantum* no trato genital em sete cães com anticorpos anti-*B. canis* detectados pela técnica de IDGA no total de 106 cães, examinados no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2016 (Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil)

Cão	Sexo	Raça	Idade (anos)	Sinais clínicos	Alterações histológicas	<i>Leishmania</i> no TG (CP+ IHQ+ HP+ qPCR)	Carga de <i>L. infantum</i> <sup>a</sup>
1	M	Mongrel	4	Magreza, alopecia, descamação, úlceras cutâneas, linfadenomegalia, esplenomegalia, onicogribose	Orquite granulomatosa intersticial, bilateral, moderada a intensa, com atrofia e degeneração dos túbulos seminíferos; Epididimite granulomatosa, moderada a intensa, bilateral	T (+); E (+); P (-)	T=6,87; E=6,30
2	M	Mongrel	3	Magreza, alopecia, descamação, úlceras cutâneas, linfadenomegalia, esplenomegalia, onicogribose	Orquite granulomatosa intersticial, bilateral, moderada a intensa, com atrofia e degeneração dos túbulos seminíferos; Epididimite granulomatosa unilateral, moderada a intensa; Prostatite linfo-plasmocitária discreta com fibrose e atrofia glandular	T (+); E (+); P (+)	T=13,93; E=10,53; P=13,27
3	M	Mongrel	2	Adenite regional e esplenomegalia	Epididimite granulomatosa bilateral, moderada a intensa	T (-); E (+); P (-)	NQ
4	M	Pitbull	9	Úlcera cutânea, adenite regional	Orquite granulomatosa intersticial, bilateral, leve; Epididimite granulomatosa moderada a intensa bilateral; Prostatite linfo-plasmocitária moderada a intensa com cistos, fibrose e atrofia glândular	T (+); E (+); P (+)	T= -1,91; E=2,64; P= -1,04
5	M	Mongrel	2	Úlcera cutânea	Ausentes	T (-); E (-); P (-)	NQ
6	F	Mongrel	2	Magreza, alopecia, descamação, úlceras cutâneas, linfadenomegalia, esplenomegalia	Vulvite granulomatosa moderada a intensa; Vaginite leve na lâmina própria e perivascular (macrófagos, linfócitos e neutrófilos); Hiperplasia endometrial	Vu (+); Va (+); U (+)	Vu=4,73; Va=10,73; U=12,34
7	F	Mongrel	3	Ausentes	Vulvite granulomatosa moderada a intensa; Vaginite granulomatosa leve na lâmina própria e perivascular	Vu (+); Va (+); U (-)	NQ

M: Macho; F: Fêmea; TG: Trato genital; CP: Cultura Parasitológica; IHQ: Imuno-histoquímica; HP: Histopatologia; qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa; T: testículo; E: epidídimo; P: próstata; Vu: vulva; Va: vagina; U: útero; (+): positivo em pelo menos uma técnica para *Leishmania*; (-): negativo em todas as técnicas para *Leishmania*; NQ: not quantified; <sup>a</sup> carga parasitária de *L. infantum* expressa como logaritmo natural do número de equivalentes genômicos (gEq)/ng