

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

Bruna Nunes da Silva Agonigi

**Avaliação do Perfil Sorológico de Cães Imunizados com a Vacina Leish-Tec® Frente a  
Testes Utilizados no Imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**

Rio de Janeiro

2020

Bruna Nunes da Silva Agonigi

**Avaliação do Perfil Sorológico de Cães Imunizados com a Vacina Leish-Tec® Frente a Testes Utilizados no Imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.  
Área de concentração: Gestão e Saneamento Ambiental

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Nunes Santos

Coorientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Shênia Patrícia Corrêa Novo

Rio de Janeiro

2020

Catálogo na fonte  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde  
Biblioteca de Saúde Pública

A275a Agonigi, Bruna Nunes da Silva.  
Avaliação do perfil sorológico de cães imunizados com a vacina  
leish-tec® frente a testes utilizados no imunodiagnóstico da  
leishmaniose visceral canina / Bruna Nunes da Silva Agonigi. --  
2020.

80 f. : il. color. ; graf. ; mapas ; tab.

Orientadora: Fernanda Nunes Santos.

Coorientadora: Shênia Patrícia Corrêa Novo.

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola  
Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2020.

1. Leishmaniose Visceral - imunologia. 2. Cães. 3. Vacinas.  
4. Testes Sorológicos. 5. Brasil - epidemiologia. 6. Ensaio de  
Imunoabsorção Enzimática. 7. Leish-Tec®. I. Título.

CDD – 23.ed. – 616.9364

Bruna Nunes da Silva Agonigi

**Avaliação do Perfil Sorológico de Cães Imunizados com a Vacina Leish-Tec® Frente a Testes Utilizados no Imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.  
Área de concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Aprovada em: 24/03/2020

Banca Examinadora

Prof.<sup>a</sup> Dra. Flávia Coelho Ribeiro Mendonça

Fundação Oswaldo Cruz - Escola Politécnica Joaquim Venâncio

Prof. Dr Antonio Teva

Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda Nunes Santos

Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

Rio de Janeiro

2020

Dedico este trabalho aos meus pais  
Elisabete e Luciano.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a **Deus** pela minha saúde e por me permitir estar concluindo o curso de mestrado em saúde pública e meio ambiente na instituição Escola Nacional de saúde pública Sergio Arouca/ Fiocruz.

Aos meus pais **Luciano e Elisabete**, por todo apoio e incentivo na minha formação profissional e por serem exemplos de caráter e honestidade e me ajudarem a ser quem eu sou hoje.

Ao meu namorado **Rodrigo**, pelo carinho e compreensão em todos os momentos que precisei estar ausente e me dedicar aos estudos.

**Aos meus colegas de turma**, por toda a ajuda e pelo apoio nos momentos mais tensos nas provas e apresentações de seminário

**À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Fernanda Nunes Santos**, por todos os ensinamentos, dedicação e empenho em me ajudar em todos os momentos ao longo da elaboração desta dissertação.

**Aos professores Beatriz Oliveira e Geraldo Marcelo da Cunha** pela dedicação e empenho em me ajudar no tratamento dos dados estatísticos desse projeto.

**Ao Dr Gabriel Grimaldi**, por gentilmente me ceder as amostras utilizadas na elaboração desta dissertação.

**Ao Dr Antonio Teva e Dr<sup>a</sup>. Flavia Coelho Ribeiro Mendonça** por aceitarem fazer parte da minha banca de qualificação e por todas as contribuições ao meu projeto.

**À todos os colegas e funcionários do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) da ENSP**, por toda a ajuda sempre que necessário.

**À todos os colegas e funcionários do Laboratório Lap Clin Vigileish, do Instituto Nacional de Infectologia**, pela ajuda e ensinamentos na execução dos experimentos

**À todos os professores do programa de saúde pública e meio ambiente da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca**, na pessoa da coordenadora Dr<sup>a</sup>. Andrea Sobral, por todo o conhecimento compartilhado ao longo desses 2 anos.

## RESUMO

O desenvolvimento de vacinas contra Leishmaniose Visceral Canina (LVC) tem sido promovido como uma medida profilaxia individual. No Brasil atualmente a vacina Leish-Tec<sup>®</sup> é a principal alternativa. Sabe-se que vacinas anti-*Leishmania* sp. em cães podem gerar grande produção de anticorpos protetores que possivelmente podem alterar os resultados obtidos pelo diagnóstico sorológico preconizado pelo Ministério da Saúde para LVC, dificultado o reconhecimento de animais infectados e conseqüentemente tornando o controle da doença um desafio ainda maior. O principal objetivo do presente projeto foi a avaliação do perfil sorológico (soroconversão) dos cães vacinados com a Leish-Tec<sup>®</sup> e acompanhados com 1, 6, 18 e 24 meses após o protocolo de imunização inicial frente a testes utilizados para o imunodiagnóstico da LVC. Foi demonstrado neste estudo soropositividade das amostras nos testes TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC, IFI e ELISA *in house* em todos os tempos de acompanhamento. O ELISA *in house* foi o teste em que as amostras apresentaram uma maior soroconversão considerando o tempo total de acompanhamento (24 meses) em relação aos demais testes, em seguida foi o TR-DPP<sup>®</sup>, IFI e por último o EIE<sup>®</sup>-LVC. Foi demonstrado que o perfil obtido pelas amostras do grupo dos animais vacinados apresentou um padrão de dispersão semelhante em relação ao grupo dos animais não infectados (grupo III) para o TR-DPP<sup>®</sup> nos tempos 1 mês e 6 meses. O teste EIE<sup>®</sup>-LVC em todos os tempos analisados apresentou um padrão de dispersão semelhante ao grupo III e o ELISA *in house* apenas o tempo de 1 mês apresentou padrão de dispersão semelhante em relação ao grupo III ( $p < 0,05$ , teste de Kruskal Wallis). De acordo com o protocolo de diagnóstico da LVC pelo MS, 15 animais imunizados com Leish-Tec<sup>®</sup> foram considerados positivos podendo gerar dúvidas em relação a presença da infecção, dificultando o processo do diagnóstico e conseqüentemente, influenciando no papel epidemiológico deste cão frente a campanha de controle da doença, podendo gerar um confundimento e conseqüentemente um problema para a saúde pública.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral Canina, Reservatório Canino, Vacinas contra Leishmaniose Visceral Canina, Leish-Tec<sup>®</sup>, Diagnóstico Sorológico.

## ABSTRACT

The development of vaccines against Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) has been promoted as an individual prophylaxis measure. In Brazil, the Leish-Tec<sup>®</sup> vaccine is currently the main alternative. It is known that anti-Leishmania sp. in dogs they can generate a large production of protective antibodies that possibly can alter the results obtained by the serological diagnosis recommended by the Ministry of Health for LVC, making it difficult to recognize infected animals and consequently making the control of the disease an even greater challenge. The main objective of this project was to evaluate the serological profile (seroconversion) of dogs vaccinated with Leish-Tec<sup>®</sup> and followed up at 1, 6, 18 and 24 months after the initial immunization protocol against tests used for the immunodiagnosis of CVL. In this study, seropositivity of the samples was demonstrated in the TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-CVL, IFI and ELISA *in house* at all follow-up times. The ELISA *in house* was the test in which the samples showed a greater seroconversion considering the total follow-up time (24 months) in relation to the other tests, followed by the TR-DPP<sup>®</sup>, IFI and finally the EIE<sup>®</sup>-LVC. It was demonstrated that the profile obtained by the samples from the group of vaccinated animals showed a similar dispersion pattern in relation to the group of uninfected animals (group III) for TR-DPP<sup>®</sup> at 1 month and 6 months. The EIE<sup>®</sup>-LVC test always analyzed showed a dispersion pattern like group III and the ELISA *in house* only at 1 month showed a similar dispersion pattern compared to group III ( $p < 0.05$ , Kruskal Wallis). According to the diagnosis protocol of LVC by the MS, 15 animals immunized with Leish-Tec<sup>®</sup> were considered positive and may raise doubts regarding the presence of the infection, hindering the diagnosis process and, consequently, influencing the epidemiological role of this dog in the face of the campaign disease control, which can lead to confusion and consequently a problem for public health.

Keywords: Canine Visceral Leishmaniasis, Canine Reservoir, Canine Visceral Leishmaniasis Vaccines, Leish-Tec<sup>®</sup>, Serological Diagnosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1  | Inseto fêmea de <i>L. Longipalpis</i> ingurgitada .....  | 21 |
| Figura 2  | Esquema do ciclo biológico da Leishmaniose Visceral.....   | 21 |
| Figura 3  | Casos de Leishmaniose Visceral no mundo, referente ao ano de 2018.....   | 23 |
| Figura 4  | Casos de Leishmaniose Visceral no Brasil no ano de 2017.....   | 24 |
| Figura 5  | Esquema das doses vacinais do protocolo de imunização com a Leish-Tec® e os períodos de acompanhamento após protocolo de imunização completo.....  | 38 |
| Figura 6  | Quadro representando o número de animais e amostras de soro analisados.....  | 40 |
| Figura 7  | Resultados obtidos para a amostra 412 e 272, positivo e negativo, respectivamente.....   | 42 |
| Figura 8  | Esquema do Imunoensaio enzimático EIE – Bio-Manguinhos® .....  | 43 |
| Figura 9  | Esquema do procedimento do teste de Imunofluorescência Indireta.....   | 45 |
| Figura 10 | Soropositividade das amostras de cães vacinados com Leish-Tec® (Grupo 1) frente ao teste TR-DPP®, EIE-LVC®, Elisa <i>in house</i> e Imunofluorescência Indireta durante o período total de acompanhamento após imunização..... | 47 |
| Figura 11 | Soroconversão das amostras de cães vacinados com Leish-Tec® (Grupo 1) frente ao teste TR-DPP® durante o período total de acompanhamento após imunização.....   | 49 |
| Figura 12 | Soroconversão das amostras de cães vacinados com Leish-Tec® (Grupo 1) frente ao teste TR-DPP® durante o período total de acompanhamento após imunização.....   | 50 |
| Figura 13 | Soroconversão das amostras de cães vacinados com Leish-Tec® (Grupo 1) frente ao teste Elisa <i>in house</i> durante o período total de acompanhamento após imunização.....   | 51 |
| Figura 14 | Soroconversão das amostras de cães vacinados com Leish-Tec® (Grupo 1) frente ao teste Imunofluorescência Indireta durante o período total de acompanhamento após imunização.....   | 52 |
| Figura 15 | Box-plot dos resultados obtidos para o TR-DPP® (A), EIE® -LVC (B) e Elisa <i>in house</i> (C) para as amostras do Grupo 1, Grupo 2 (Infectados) e Grupo 3 (Não infectados).....  | 55 |

## LISTA DE TABELAS

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Número de amostras positivas no TR-DPP <sup>®</sup> , EIE <sup>®</sup> -LVC, ELISA <i>in house</i> e Imunofluorescência Indireta para o Grupo 1, nos tempos analisados de 1, 6, 18 e 24 meses após o início do protocolo de imunização.....  | 48 |
| Tabela 2 | Resultados obtidos pela análise dos soros de animais vacinados, animais infectados e não infectados utilizando as técnicas sorológicas TR-DPP <sup>®</sup> , EIE <sup>®</sup> -LVC, ELISA <i>in house</i> .....  | 53 |
| Tabela 3 | Soropositividade obtida para os animais que apresentaram o período de acompanhamento completo do estudo (24 meses após o protocolo de imunização inicial) .....  | 57 |
| Tabela 4 | Resultados obtidos para cada cenário preconizado pelo Ministério da Saúde, cenário atual composto pelo TR-DPP <sup>®</sup> como triagem e EIE <sup>®</sup> -LVC como confirmatório e cenário antigo composto pelo EIE <sup>®</sup> -LVC como triagem e Imunofluorescência Indireta como confirmatório..... | 59 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|        |   |
|--------|---|
| CN     | Controle Negativo                                   |
| CP     | Controle Positivo                                   |
| EIE    | Ensaio Imunocromatográfico Enzimático               |
| FML    | Ligante de Fucose e Manose                          |
| IFI    | Imunofluorescência Indireta                         |
| IOC    | Instituto Oswaldo Cruz                              |
| LC     | Leishmaniose Cutânea                                |
| LV     | Leishmaniose Visceral                               |
| LVC    | Leishmaniose Visceral Canina                        |
| MAPA   | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MS     | Ministério da Saúde                                 |
| OMS    | Organização Mundial da Saúde                        |
| TR-DPP | Teste Rápido Dual Plataform                         |
| WHO    | World Health Organization                           |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|   |                  |
|---|------------------|
| % | Porcentagem      |
| ® | Marca Registrada |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>2.REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>  | <b>19</b> |
| 2.1.ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....   | 19        |
| 2.1.1.Agente etiológico .....   | 19        |
| 2.1.2.Transmissão e Ciclo biológico.....  | 19        |
| 2.1.3.Epidemiologia da Leishmaniose Visceral no Mundo .....   | 22        |
| 2.1.4.Epidemiologia no Brasil .....   | 23        |
| 2.1.5.Controle da Leishmaniose Visceral.....  | 24        |
| 2.1.6.Leishmaniose Visceral Humana .....  | 27        |
| 2.1.7.Leishmaniose Visceral Canina.....   | 27        |
| 2.1.8.Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina .....   | 28        |
| 2.2.RESPOSTA IMUNOLÓGICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA .....  | 30        |
| 2.3.VACINAS CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....  | 32        |
| <b>3.JUSTIFICATIVA .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>4.OBJETIVOS.....</b>   | <b>36</b> |
| 4.1. OBJETIVO GERAL .....   | 36        |
| 4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 36        |
| <b>5.METODOLOGIA.....</b>   | <b>37</b> |
| 5.1.DELINEAMENTO DO ESTUDO.....   | 37        |
| 5.2.ASPECTOS ÉTICOS.....  | 37        |
| 5.3.ESTRATIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DA POPULAÇÃO DE ESTUDO.....  | 38        |
| 5.3.1.Soro de cães imunizados (Grupo I).....  | 38        |
| 5.3.2.Cães Infectados (Grupo II).....   | 40        |
| 5.3.3.Soro de cães do grupo Controle Negativo (Grupo III).....  | 40        |
| 5.4. TESTES DE IMUNODIAGNÓSTICO DA LVC PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL SOROLÓGICO DOS CÃES VACINADOS COM LEISH-TEC®..... | 26        |
| 5.4.1.TR-DPP® Bio-Manguinhos .....  | 41        |
| 5.4.2.EIE®-LVC Bio-Manguinhos .....   | 42        |
| 5.4.3.ELISA <i>in house</i> .....   | 43        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>5.4.4. Imunofluorescência Indireta.....</b>   | <b>44</b> |
| 5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 30        |
| <b>6. RESULTADOS .....</b>   | <b>46</b> |
| 6.1. SOROCONVERSÃO DAS AMOSTRAS DE CÃES VACINADOS COM LEISH-TEC® (GRUPO I) FRENTE AO TESTE TR-DPP®, EIE®-LVC, ELISA <i>in house</i> E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA NO PERÍODO TOTAL DE ACOMPANHAMENTO (DE 1 A 24 MESES APÓS O PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO INICIAL)..... | 46        |
| 6.2. SOROCONVERSÃO DAS AMOSTRAS DE CÃES VACINADOS COM LEISH-TEC® (GRUPO I) FRENTE AO TESTE TR-DPP® NOS DIFERENTES TEMPOS ANALISADOS (1, 6, 18 E 24 MESES) APÓS O PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO INICIAL.....  | 48        |
| 6.3. SOROCONVERSÃO DAS AMOSTRAS DE CÃES VACINADOS COM LEISH-TEC® (GRUPO I) FRENTE AO TESTE EIE®-LVC NOS DIFERENTES TEMPOS ANALISADOS (1, 6, 18 E 24 MESES) APÓS O PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO INICIAL.....   | 49        |
| 6.4. SOROCONVERSÃO DAS AMOSTRAS DE CÃES VACINADOS COM LEISH-TEC® (GRUPO I) FRENTE AO TESTE ELISA <i>in house</i> NOS DIFERENTES TEMPOS ANALISADOS (1,6,18 E 24 MESES) APÓS O PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO INICIAL.....  | 50        |
| 6.5. SOROCONVERSÃO DAS AMOSTRAS DE CÃES VACINADOS COM LEISH-TEC® (GRUPO I) FRENTE AO TESTE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA NOS DIFERENTES TEMPOS ANALISADOS (1,6,18 E 24 MESES) APÓS O PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO INICIAL. ....   | 52        |
| 6.6. PERFIL DE SOROCONVERSÃO OBTIDO PELOS ANIMAIS VACINADOS (GRUPO I) EM COMPARAÇÃO AOS INFECTADOS (GRUPO II) E NÃO INFECTADOS (GRUPO III) UTILIZANDO AS TÉCNICAS DE TR-DPP®, EIE-LVC®, ELISA <i>in house</i> E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA. ....                  | 53        |
| 6.7. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SOROCONVERSÃO PARA OS CÃES ACOMPANHADOS EM TODOS OS TEMPOS DE ANÁLISE APÓS PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO INICIAL.....  | 56        |
| 6.8. COMPARAÇÃO CENÁRIO ATUAL EM RELAÇÃO AO CENÁRIO ANTIGO PRECONIZADO PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE.....   | 58        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>7.DISSCUSSÃO.....</b>                 | <b>60</b> |
| <b>8.CONCLUSÕES.....</b>                 | <b>70</b> |
| <b>9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b> | <b>71</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são doenças infecciosas causadas por diferentes espécies de protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. A doença pode ser encontrada nas regiões do Novo Mundo como América do Sul, América Central e Norte do Texas, como também no Velho Mundo como Europa, África, Oriente Médio, Ásia Central e subcontinente indiano (WHO, 2010). A doença é predominantemente de clima tropical, entretanto estende-se para regiões de clima temperado como o norte do Texas, onde o tratamento independe de problemas financeiros e logísticos como ocorre nos demais focos (BUFFET, 2008).

As formas clínicas se dividem em dois grupos principais, um deles é responsável pela Leishmaniose Tegumentar (Leishmaniose Cutânea, Muco-cutânea e Cutânea Difusa), em que os protozoários envolvidos são: *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) aethiopica*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) peruviana* (WHO, 2010). As três principais espécies circulantes no Brasil são: *Leishmania (Viannia) brasiliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, e *Leishmania (Viannia) guyanensis*, porém recentemente na região norte e nordeste, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lindenberg* e *Leishmania (Viannia) shawi* (BRASIL, 2017). Já o segundo grupo, causa a Leishmaniose Visceral (LV), conhecida como “Calazar”, este apresenta maior relevância devido ao grau de letalidade da doença. Os protozoários pertencentes a este grupo são: *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum* sin. *Leishmania (Leishmania) chagasi*, sendo apenas está última encontrada no Brasil. (FOGANHOLI, 2011).

No Brasil, a LV é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* e transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia Longipalpis*, sendo o cão considerado o principal reservatório doméstico em meio urbano. Porém, além dos reservatórios domésticos, o parasito pode ser encontrado em reservatórios silvestres, como roedores, marsupiais e canídeos silvestres (COSTA, 2011). O Brasil é responsável por 90% dos casos da América latina figurando ao lado de países como Bangladesh, Índia, Etiópia, Nepal e Sudão, responsáveis pela maioria dos casos no mundo (WHO, 2018).

A transmissão da LV ocorre em todas as regiões do país (WHO, 2018). Recentemente, ocorreram mudanças significativas no padrão de transmissão, inicialmente predominando em ambientes rurais e periurbanos e atualmente, nos grandes centros urbanos

como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros. No Brasil a LV está registrada em 19 das 27 Unidades da Federação, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone (BRASIL, 2014a).

Uma das doenças prioritárias pela OMS (Organização Mundial da Saúde), pode-se dizer que a leishmaniose se tornou uma doença complexa e ao mesmo tempo, negligenciada devido à grande variedade de formas clínicas existentes e, com isso a dificuldade de se estabelecer o tratamento adequado (WHO, 2010).

O diagnóstico para os casos humanos é bastante complexo, pois podem apresentar sintomas e sinais clínicos semelhantes a doenças como a Doença de Chagas, Malária, Esquistossomose, Febre Tifoide e Tuberculose, doenças que geralmente se desenvolvem em regiões endêmicas para LV. Pacientes com LV apresentam febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, leucopenia, anemia, hipergamaglobulinemia, tosse, dor abdominal, diarreia, perda de peso e caquexia (GONTIJO & MELO, 2004). O diagnóstico da doença humana preconizado pelo Ministério da Saúde é realizado através de testes sorológicos, utilizando o teste Imunocromatográfico LSH Ab ECO de confirmação laboratorial de casos suspeitos da doença humana (BRASIL, 2019)

Para a doença nos cães, há um amplo espectro de sinais clínicos, desde animais aparentemente saudáveis, passando por sintomáticos, até estágios severos da doença. Os sinais viscerais mais comuns observados são linfadenopatia, emaciação, sinais possíveis de insuficiência renal (poliúria, polidipsia, vômito), neuralgia, poliartrite, poliomiosite, e outros sinais clínicos, sendo que aproximadamente um terço dos cães apresenta febre e esplenomegalia (TILLEY & SMITH, 2008). Alguns estudos realizados na Europa e no Brasil indicam que a doença nos cães pode permanecer clinicamente inaparente por longos períodos (ABRANCHES et al., 1991 b; DANTAS-TORRES et al., 2006). Os animais assintomáticos também representam fontes de infecção para os vetores (MOLINA, et al., 1994). Os estudos mostram que a razão para a ausência de sintomas clínicos é condicionada a imunocompetência do animal e estágio em que a doença se encontra (GONTIJO & MELO, 2004).

As atividades de controle da LV no Brasil são: tratamento de casos humanos, identificação e eutanásia de cães infectados, controle do vetor e medidas de educação em saúde (BRASIL, 2014a). Os cães se apresentam como os principais reservatórios da LV, eles apresentam diferentes formas parasitárias infectantes disponíveis, inclusive de pele integra

e a proximidade do cão no domicílio apresentando uma relação direta com o homem. Dessa forma, o cão se torna a principal fonte de infecção para o vetor principalmente em áreas urbanas. (MONTEIRO et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2006; DEANE & DEANE, 1955). Para o processo de controle dos reservatórios infectados há necessidade da precisão e confiabilidade dos métodos de diagnósticos. Entretanto, estima-se que os métodos de diagnóstico para Leishmaniose Visceral Canina (LVC), atualmente, têm minimizado o número de cães infectados, devido à ausência da combinação de um método fácil de ser executado associado a um antígeno que seja altamente específico, o que dificulta o controle da doença, principalmente para os cães assintomáticos (BERRAHAL et al., 1996). Atualmente, existem uma grande variedade de métodos para diagnóstico canino, como os testes parasitológicos, testes sorológicos e testes moleculares. O diagnóstico canino é realizado utilizando teste de triagem Imunocromatográfico TR-DPP® e a confirmação se dá através do ELISA (EIE®-LVC) (BRASIL, 2011). O Ministério da Saúde preconiza os ensaios sorológicos por serem de fácil execução, mais rápidos, um custo mais baixo (ALVAR et al., 2004) e por ter uma adequada confiabilidade, já que cães infectados apresentam elevados níveis de imunoglobulinas que reagem com os antígenos parasitários de *Leishmania (Leishmania) infantum* (GOMES et al., 2008).

A primeira opção de tratamento da doença para os casos humanos são os medicamentos à base de antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio, produtos com características químicas similares, com o mesmo grau de toxicidade. O tempo do tratamento assim como a dosagem do medicamento dependem da forma clínica da doença e, em alguns casos, é necessário a combinação de mais de um tratamento (REY, 2011; GONTIJO & MELO, 2004; DE QUEIROZ et al., 2010; QUEIROZ et al., 2004; PELISSARI et al., 2011).

O tratamento para cães não deve ser realizado com os mesmos fármacos utilizados no tratamento humano ou fármacos que não tenham o registro do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), para que se evite resistência parasitária. Além disso, não se tem certeza do real papel do cão como reservatório no período de tratamento já que não existem evidências da redução ou interrupção da transmissão (BRASIL, 2008a). Diante disto, em 2017 o MAPA autorizou a utilização da Miltefosina (Milteforan®- Virbac®) para o tratamento da LVC, por não se tratar de uma droga utilizada para o tratamento da LV humana. Esta é uma ferramenta de controle individual de tratamento, estando disponível

apenas nas clínicas veterinárias particulares, por conta do proprietário, e não se encontra nas redes públicas de saúde (BRASIL, 2016).

Dessa forma, devido à complexidade do conjunto de métodos de controle da LV no país e da baixa eficácia do tratamento no reservatório, não interrompendo a transmissão, a vacinação profilática estabelece-se como uma alternativa para o controle preventivo dos cães não infectados (LEMESRE et al., 2005; PALATNIK-DE-SOUZA, 2008). Entretanto, o Ministério da Saúde, ainda não preconiza a utilização de vacinas como metodologia profilática de controle, somente como medida profilática individual (BRASIL, 2016).

Foram desenvolvidas duas vacinas anti-LVC e lançadas comercialmente no Brasil, a Leishmune® (Zoetis®, New Jersey, EUA) e Leish-Tec® (Hertape Calier Saúde Animal®) (CAMPOS, et al., 2017). A Leishmune® é formada pelo antígeno FML, complexo glicoproteico ligante de Fucose e Manose de *Leishmania (Leishmania) donovani*, que se encontra na superfície do parasito durante o seu ciclo (PALATNIK-DE-SOUZA, et al., 1994). Já a Leish-Tec®, utiliza o antígeno A2, uma proteína específica do estágio amastigota de *Leishmania (Leishmania) donovani* (GHOSH et al., 2001). No entanto, a Leishmune® não atendeu aos requisitos dos estudos de fase III para avaliação da eficácia vacinal, com isso a sua comercialização foi suspensa pelo MAPA (BRASIL, 2014b). Dessa forma, a única vacina liberada para ser comercializada no Brasil é a Leish-Tec®, considerada como ferramenta de profilaxia individual.

Os testes sorológicos são preconizados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da LVC. Um grande problema atribuído a imunização na LVC é que esta pode alterar o diagnóstico obtido por estes testes sorológicos. Anticorpos anti-*Leishmania* sp. podem ser detectáveis em cães vacinados por vários meses, sendo difícil a diferenciação entre cães vacinados e infectados, o que pode gerar discordância na identificação de cães infectados no controle da doença (MARCONDES et.al., 2011; MARCONDES et.al., 2013). Dessa forma, esse projeto teve por finalidade avaliar o perfil sorológico dos cães imunizados com a Leish-Tec® e sua possível interferência no diagnóstico sorológico.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

As leishmanioses são infecções, não contagiosas parasitárias, causadas por protozoários intracelulares, seu ciclo biológico atinge diversas espécies de animais, domésticos e silvestres, estando envolvido ainda um vetor biológico e o ser humano (COURA, 2013).

#### 2.1.1 Agente etiológico

O agente etiológico da LV pertence à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*. Infecções causadas por *Leishmania (Leishmania) donovani* ocorrem na região da Índia e África (FRASER, 2008). Nesses locais a leishmaniose apresenta-se como uma antropozoonose, necessitando somente do vetor invertebrado para a disseminação da doença. Infecções por *Leishmania (Leishmania) infantum* (sin. *Leishmania (Leishmania) chagasi*), ocorrem em regiões como Mediterrâneo, Oriente Médio, América latina e África, necessitando além do vetor, reservatórios domésticos e silvestres, se comportando como uma zoonose (WHO, 2010).

#### 2.1.2 Transmissão e Ciclo biológico

No Brasil a LV tem transmissão zoonótica e a disseminação ocorre através da picada da fêmea infectada do inseto vetor flebotomíneo (BRASIL, 2014a). Em ambientes domésticos, o cão se apresenta como o principal reservatório natural da doença, se colocando como uma excelente fonte de infecção para o vetor, principalmente em áreas urbanas (MONTEIRO, 2005). Devido a sua proximidade com o homem e outros animais domésticos em ambientes rurais e urbanos, como também por apresentar grande quantidade de formas parasitárias infectantes disponíveis ao vetor na pele (TESH, 1995). Já em ambientes silvestres, canídeos como raposas (*Dusicy onvetulus* e *Cerdocy onthous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) são considerados as principais fontes de infecção (BRASIL, 2014a).

Os flebotomíneos são insetos pequenos, frágeis, popularmente, conhecidos como “mosquito palha”, “asa dura” ou “birigui” entre outras denominações comuns (BRASIL, 2014a). São densamente revestidos por cerdas, geralmente apresentam atividade crepuscular

ou noturna, possuem dois pares de asas hialinas que permitem um deslocamento por saltos (LEWIS, 1974) (Figura 1), apresentam baixa capacidade de bater asas e são naturalmente silvestres (BRAZIL; BRAZIL, 2003). Os flebotomíneos possuem alta capacidade de se adaptar no peridomicílio e domicílio (MACEDO, et.al., 2008). Os hábitos alimentares desses insetos envolvem fontes de açúcar para produzir energia e manter a homeostasia (AZEVEDO et al., 2011). Somente as fêmeas são hematófagas, já que necessitam da ingestão de sangue para o desenvolvimento e a maturação de seus ovários. (SHERLOCK, 2003).

No Brasil existem duas espécies responsáveis pela transmissão da LV, *Lutzomyia longipalpis*, principal transmissor de *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Lutzomyia cruzi*, o qual foi recentemente encontrado em regiões do Mato Grosso do Sul. A espécie *Lutzomyia longipalpis* pode ser encontrada no Nordeste, Norte, principalmente em regiões de matas, Centro-Oeste e Sudeste no peridomicílio, em galinheiro, chiqueiros, canil, paiol, entre outros ambientes e no intradomicílio (BRASIL, 2014a).

Os protozoários disponíveis pela LV apresentam duas formas distintas, uma intracelular e outra extracelular. A forma intracelular, denominada amastigota, apresenta flagelo inaparente e encontra-se no interior dos vacúolos lisossomais de células presentes no sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (ALMEIDA et al., 2003). As formas promastigotas apresentam flagelo livre e encontram-se no intestino do vetor invertebrado, são extracelulares e encontram-se na forma livre ou aderidas as microvilosidades ou cutícula intestinal e migram para a faringe do inseto no ato do repasto sanguíneo (BLANCO, 2017).

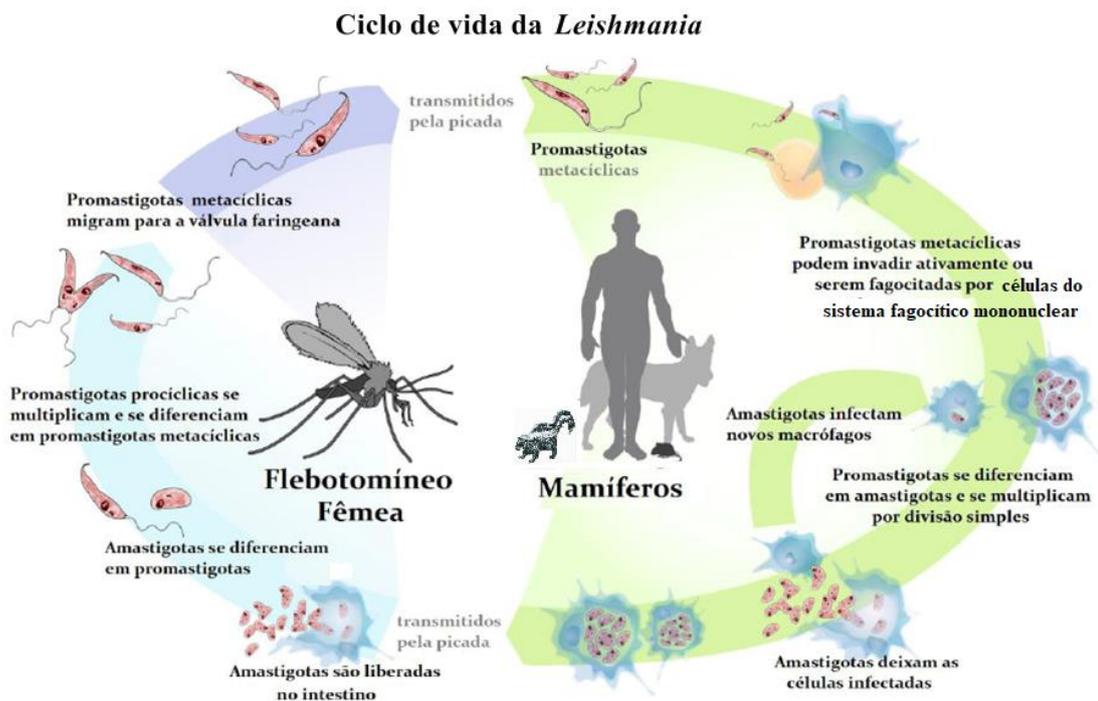
O ciclo tem início quando o vetor invertebrado realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, adquirindo as formas amastigotas. No trato digestivo do inseto, essas amastigotas são liberadas e ocorre a multiplicação e o desenvolvimento das formas infectantes, as promastigotas metacíclicas, que no próximo repasto sanguíneo serão inoculadas em um novo hospedeiro vertebrado não infectado. As formas promastigotas infectam células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos, diferenciando-se em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária. Os macrófagos infectados podem se romper e liberar o parasito, que por sua vez pode infectar novas células e disseminar-se por via hematogênica e ou linfática para outros tecidos, como baço, medula óssea e fígado. O ciclo se completa quando um novo flebotomíneo ingere o sangue infectado com as formas amastigotas (AEBISCHER, 1994; ASHFORD, 1998; BLANCO, 2017). A Figura 2 representa o esquema resumido do ciclo biológico da Leishmaniose Visceral.

**Figura 1.** Inseto fêmea de *Lutzomyia Longipalpis* ingurgitada.



Fonte: BRASIL, 2014a.

**Figura 2.** Esquema do ciclo biológico da Leishmaniose Visceral



Fonte: adaptado de HARHAY, et.al., 2011

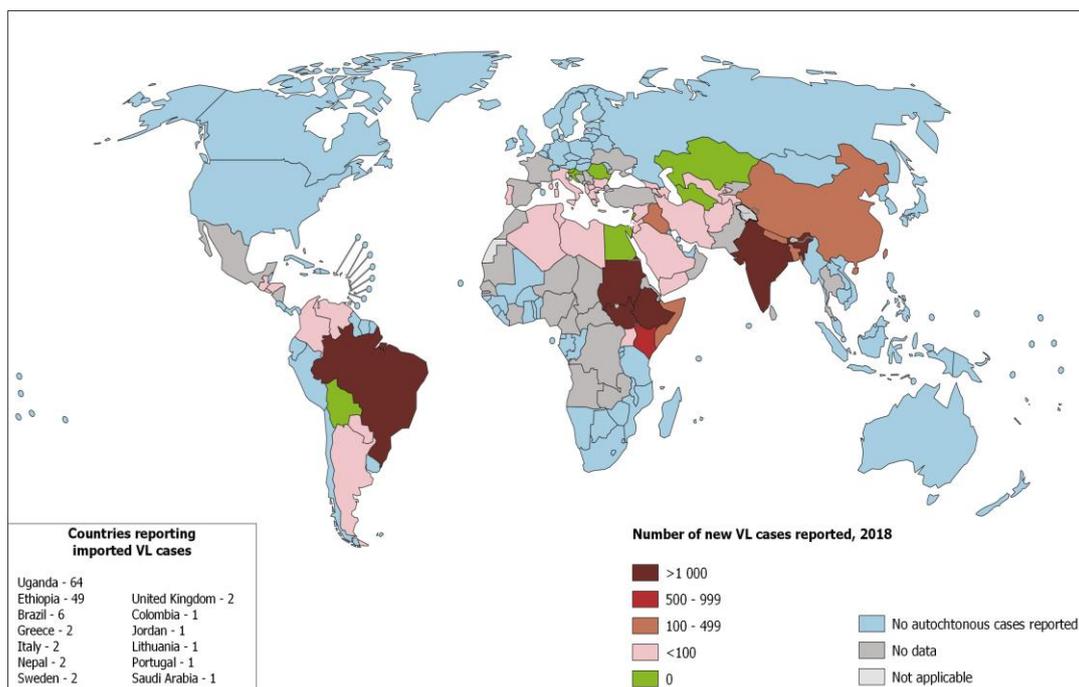
### 2.1.3 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral no Mundo

A LV tem ampla distribuição geográfica e está associada a populações vulneráveis e a pobreza na Ásia, Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas (WHO, 2010). Os casos de leishmaniose atualmente estão distribuídos em 97 países que são considerados endêmicos para a doença localizados em regiões tropicais e subtropicais (WHO, 2015; DESJEUX, 2004; ALVAR et al., 2012; GUERIN et.al., 2002). Estima-se que 200.000 a 400.000 novos casos de Leishmaniose Visceral ocorram no mundo a cada ano. Mais de 90% dos casos globais são notificados na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil. Além destes, há casos reportados também no Afeganistão, Algéria, Iran, Peru, Arábia Saudita e Síria. Epidemias severas foram relatadas no passado na região do sul do Sudão, num contexto de guerra civil e fome, sendo responsável por cerca de 100.000 mortes entre 1984 e 1994 (SEAMAN; MERCER; SONDORP, 1996).

No ano de 2018, 21 países foram classificados endêmicos para LV dentre eles se encontram Bangladesh, Butão, Romênia, Somália, Sudão do sul, Uganda Ucrânia e Zâmbia. Mais de 90% dos casos globais de LV ainda são encontrados em países como Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão como mostrado na Figura 3. (WHO, 2020).

Na América Latina, a LV é endêmica em 12 países. A maior parte dos casos, cerca de 90%, ocorrem no Brasil, mas também existem casos na Argentina, Colômbia, Paraguai e Venezuela. A OMS a partir do ano de 2013 tem realizado o monitoramento da incidência de casos de leishmaniose e o controle de casos importados relatando o número de casos autóctones separadamente. No período de 2001 a 2016, 55.530 casos humanos foram notificados nas Américas. A maior concentração de casos ocorreu no sexo masculino com 66,3% e as faixas etárias com maior influência foram: maior de 10 anos, maior que 20 e menor do que 50 anos e maior de 50 anos (WHO, 2018).

**Figura 3.** Casos de Leishmaniose Visceral no mundo, referente ao ano de 2018.



Fonte: WHO, 2020

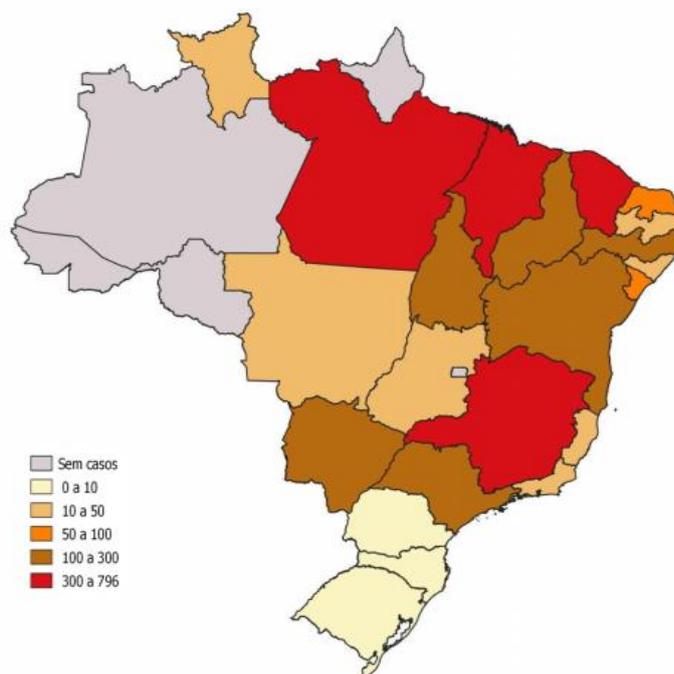
#### 2.1.4 Epidemiologia no Brasil

No Brasil, no passado, a doença era endêmica em áreas tipicamente rurais e muitos surtos epidêmicos eram relatados na região Nordeste. Atualmente, observa-se que a doença tem apresentado também uma expansão para áreas urbanas de médios e grandes portes, tornando-se um crescente problema de saúde pública em franca expansão geográfica. No período de 1984 a 2002 aproximadamente 66% dos casos ocorreram nos Estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Em 2003, os estados que apresentaram as maiores taxas de incidência foram Tocantins, Piauí, Maranhão, Mato Grosso do Sul e Roraima (SILVA, 2007).

O aparecimento de novos focos se deu por conta das transformações ambientais que ocorreram principalmente devido ao intenso fluxo migratório, graves quadros de pobreza decorrentes de distorções na distribuição de renda e o processo de urbanização crescente. Este fenômeno de transformações levou a uma redução do espaço ecológico da doença, facilitando sua expansão. Dessa forma, a doença atingiu regiões urbanas como Fortaleza (CE), Araguaína (TO), Belo Horizonte (BH), Campo Grande (MS), Rio de Janeiro (RJ) e regiões como Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) (BRASIL, 2014a).

Em 2017 há registros de uma quantidade elevada de casos nos estados Minas gerais, Pará, Maranhão, Ceará, São Paulo, Mato Grosso, Bahia, Piauí, Tocantins e Pernambuco. A Figura 4 mostra o mapa disponibilizado pelo Ministério da Saúde com os dados dos casos referentes a LV no Brasil nível municipal referente ao ano de 2017 (BRASIL, 2020).

**Figura 4.** Casos de Leishmaniose Visceral no Brasil no ano de 2017.



Fonte: BRASIL, 2020

### 2.1.5 Controle da Leishmaniose Visceral

No Brasil, as principais ações utilizadas para o controle da LV são: o tratamento de casos humanos, controle dos vetores, a retirada dos cães soropositivos para eutanásia, além das medidas de educação e saúde. Este conjunto de ações são importantes devido a indisponibilidade de uma vacina anti-*Leishmania* a ser utilizada como medida de controle preventivo de massa para cães e humanos (BRASIL, 2014a).

Durante aproximadamente sete décadas o tratamento para humanos de escolha prioritária eram os antimoniais pentavalentes, antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio, produtos com características químicas similares, com o mesmo grau de toxicidade (MALTEZOU, 2008). O tempo do tratamento assim como a dosagem do medicamento dependem da forma clínica da doença e, em alguns casos, é necessário a combinação de mais

de um tratamento (REY, 2011; GONTIJO & MELO, 2004; DE QUEIROZ et al., 2010; QUEIROZ et al., 2004; PELISSARI et al., 2011). Outro fármaco disponível para o tratamento da LV é a anfotericina B. O uso da anfotericina B lipossomal tem apresentado efeitos positivos na redução dos efeitos colaterais como febre, calafrios, e tromboflebite e, ocasionalmente, hipocalcemia, nefrotoxicidade e miocardite (OLLIARO et al., 2005).

Em 1996, através de um estudo matemático, Dye enfatizou uma maior eficácia no controle vetorial como principal estratégia, devido a maior eficácia do uso de inseticidas na diminuição da disseminação da LV. Para a redução da densidade vetorial é necessário que as características epidemiológicas e entomológicas específicas de cada localidade seja levado em conta (DYE, 1996). Como medida de controle coletivo é indicado o uso de inseticidas de efeito residual, repelentes e mosquiteiros. Além disso, evitar o acúmulo de lixo, especialmente o de matéria orgânica (BRASIL, 2014a).

O inseticida preconizado no controle da LV é um piretroide borrifado, aplicado nas paredes no intradomicílio e peridomicílio das residências. A dificuldade encontrada na realização do controle químico é o alto custo e a não autorização do proprietário na entrada do domicílio. Essas limitações têm promovido à redução do uso de inseticidas para o controle vetorial nos últimos anos (ZUBEN & DONALÍSIO, 2015).

A sociedade atual enfrenta grandes dificuldades em promover o estabelecimento de medidas de controle da LV. Há uma grande resistência da população em aceitar o acesso as residências pela equipe do Programa de vigilância e controle da LV, principalmente na execução da eutanásia dos cães. Além disso, pode-se citar a baixa prioridade fornecida a leishmaniose frente a demais doenças, a relativa acurácia do diagnóstico, o baixo impacto referente a educação e a saúde ambiental. As pessoas são vistas como passivas frente a essa questão, além dos problemas crônicos de saneamento ambiental. A falta de insumos, recursos humanos e financeiros contribuem para a descontinuidade dessas ações (WERNECK, 2016).

A eutanásia de cães infectados é uma medida bastante discutida em relação a sua efetividade, principalmente quando utilizada de forma isolada, sem a utilização de outras medidas de controle preconizadas (WERNECK, 2014). Embora o Ministério da Saúde recomende a eutanásia de cães, esta ação ainda é bastante discutida pois apresenta impactos temporários na incidência da LVC e no surgimento dos casos humanos. Além disso, há uma alta resistência por parte dos proprietários em entregar os animais para a eutanásia principalmente os cães assintomáticos devido a intensa relação afetiva que apresentam com os animais (LAINSON, 2005).

As medidas de educação e saúde são de grande importância no controle da LV. A distribuição de folhetos informativos, visitas domiciliares e a disseminação de informação é fundamental para trazer informação a população agir de forma a evitar a doença. Entretanto, essas medidas são pouco valorizadas, pois existe a falta de técnicos da saúde capacitados e treinados para exercer essa função, o que torna uma grande limitação ao estabelecimento da vigilância em saúde (ZUBEN & DONALÍSIO, 2015).

O tratamento de cães não é recomendado nem pelo Ministério da Saúde nem pela Organização Mundial da Saúde, devido ao crescente número de casos de resistência aos fármacos de uso humano conforme a Portaria IM nº 1.426 (2008) que regulamenta o Decreto nº 51.838, 1963. Além disso, não se tem certeza do real papel do cão como reservatório no período de tratamento já que não existem evidências da redução ou interrupção da transmissão (BRASIL, 2008b). Diante disso, o tratamento disponível para a LVC deve-se respeitar as normas estabelecidas pela Portaria (1.426/2008), em que o tratamento dos cães é permitido com medicamentos registrados pelo MAPA e que não sejam usados no tratamento da doença em humanos.

Em 2017, o MAPA autorizou a utilização da Miltefosina (Milteforan<sup>®</sup> - Virbac<sup>®</sup>) para o tratamento da LVC com a finalidade de obter uma maior qualidade de vida para os animais infectados, entretanto, a utilização da Miltefosina apenas diminui os sinais clínicos apresentados pelo animal, não promove a cura parasitológica, ou seja, não impede que o mesmo continue sendo portador da infecção. Esta é uma ferramenta de controle individual de tratamento, estando disponível apenas nas clínicas veterinárias particulares e trata-se única e exclusivamente de uma escolha do responsável pelo animal, de caráter individual e não se encontra nas redes públicas de saúde (BRASIL, 2016). Portanto, é permitido o uso deste fármaco no tratamento individual de cães com diagnóstico laboratorial confirmado para LVC, desde que se cumpra o protocolo de tratamento fornecido pelo fabricante, respeitando a necessidade de reavaliação clínica, laboratorial e parasitológica periódica (CFMV, 2017). Um estudo realizado por Araújo e colaboradores (2018) demonstrou que o uso da Miltefosina combinada com alopurinol e domperidona teve potencial positivo na redução dos sinais clínicos e da carga parasitária, sendo uma boa alternativa para o tratamento da LVC.

Estudos voltados no desenvolvimento de vacinas efetivas como medida preventiva devem ser levados em consideração já que a cura parasitológica em cães ainda não foi relatada (PALATNIK-DE-SOUZA, 2008). Além disso, a utilização de vacinas profiláticas

apresenta uma maior aceitabilidade por parte da sociedade e mais fácil de ser aplicada em controles em massa. Entretanto, a resposta humoral proveniente das vacinas comercializadas no país até hoje pode gerar uma alteração nos testes sorológicos preconizados pelo Ministério da Saúde, ocasionando dificuldades na interpretação dos resultados entre cães vacinados e infectados. Atualmente as vacinas que existem para a doença canina não possuem características e nem efetividade para serem utilizadas no controle em massa da doença (CAMPOS, 2017).

### **2.1.6 Leishmaniose Visceral Humana**

A forma visceral da doença apresenta um alto índice de letalidade se não tratada, atingindo órgãos viscerais, com comprometimento do fígado e baço, afetando também a medula óssea. Nessa situação raramente são observadas as lesões na pele ocasionada pela picada do flebótomo (HANDMAN, 2001).

O quadro clínico da LV em humanos caracteriza-se por febre, fadiga, fraqueza e perda de apetite e peso e aumento de linfonodos, esplenomegalia e hepatomegalia. Em casos mais avançados a esplenomegalia pode aumentar e causar distensão abdominal. Além disso, o paciente pode apresentar quadros de infecções concomitantes como pneumonia, diarreia ou tuberculose. Os indivíduos mais suscetíveis a essa infecção são principalmente crianças e indivíduos imunodeprimidos (CHAPPUIS et.al., 2007).

### **2.1.7 Leishmaniose Visceral Canina**

A LVC é uma doença sistêmica, crônica e grave causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum*. Os cães afetados com essa patologia podem apresentar os mais diferentes sintomas ou ainda podem ser assintomáticos por longos períodos, o que gera uma grande dificuldade para o diagnóstico. Diante disso, podem ser classificados de acordo com os sinais clínicos apresentados: assintomáticos (ausência de sinais), oligossintomáticos (os cães apresentam de 1 a 2) e sintomáticos (apresentam acima de 3) (ABRANCHES et al., 1991.a). As manifestações clínicas mais comuns que cães infectados apresentam são: febre por longos períodos, perda de peso até a caquexia, perda de pelos, lesões dermatológicas, úlceras de pele, onicogribose (crescimento exagerado das unhas) lesões oculares, esplenomegalia, hepatomegalia e aumento dos nódulos linfáticos e insuficiência renal. (LIMA et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005; BARROUIN-MELO et al., 2006);

O diagnóstico da doença canina pode se tornar desafiador, já que muitos cães em área endêmica são assintomáticos, ou apresentam apenas uma ou poucas manifestações clínicas, o que podem confundir-se com outras patologias, além do aparecimento de sinais pouco comuns como lesões no sistema digestivo, problemas respiratórios, desregulações homeostáticas como problemas na coagulação, lesões cardiovasculares e problemas na pele (BLAVIER et al., 2001). O fato de aproximadamente 60 a 80% dos cães permanecerem assintomáticos aumenta o potencial de transmissão da doença, uma vez que não são identificados como infectados e conseqüentemente, não são retirados do ambiente (QUEIROZ et al., 2010).

Alguns fatores são responsáveis por tornar o cão um dos principais reservatórios domésticos da LV: ele apresenta formas amastigotas de *Leishmania* em pele íntegra, configurando uma excelente fonte de infecção aos vetores; além disso a proximidade do cão com o homem, já que é o principal animal doméstico escolhido tanto em áreas rurais como urbanas; e a coexistência da LVC com a doença humana em todos os focos conhecidos no Brasil (DEANE & DEANE, 1955), valendo dizer que a epidemia canina precede a epidemia humana (ALENCAR, 1959; BRASIL, 2014).

### **2.1.8 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**

O diagnóstico da LVC pode ser feito, através do diagnóstico clínico-epidemiológico, parasitológico, molecular e sorológico. O diagnóstico clínico- epidemiológico é feito quando o animal apresenta histórico de presença em área endêmica associado aos sinais clínicos compatíveis com LVC (FARIA; ANDRADE, 2012). Entretanto, esse diagnóstico é difícil, uma vez que cerca de 60 a 80% dos animais que vivem em áreas endêmicas e possuem contato com o parasito podem não apresentar sinais clínicos associados (DE QUEIROZ, 2010).

O diagnóstico parasitológico é considerado padrão ouro na identificação de cães infectados, pois permite a visualização do parasito e apresentam especificidade muito alta e uma sensibilidade variável devido a heterogeneidade da distribuição do parasito em um mesmo tecido. Para se obter sensibilidades mais elevadas, em torno de 98%, são utilizadas amostras de pele íntegra, aspirados de linfonodos, medula óssea, baço e de fígado o que torna o método muito invasivo (GONTIJO & MELO, 2004) e impraticáveis em larga escala e em inquéritos epidemiológicos (SUNDAR & RAI, 2002). Entretanto, esse método pode gerar

resultados falso-negativos devido à presença de uma baixa concentração de parasitos nas amostras, principalmente nos cães assintomáticos (GOMES, 2008).

No Brasil, o diagnóstico preconizado pelo Ministério da Saúde é o sorológico, devido a necessidade da utilização de um método menos invasivo, de baixo custo, rápido para a triagem dos animais e de confiabilidade adequada (ALVAR et.al., 2004; GOMES, 2008). Segundo a Nota Técnica do Ministério da Saúde número 1 de 2011, o teste imunocromatográfico (TR-DPP®) deverá ser utilizado como teste de triagem, utilizando amostras de sangue, soro ou plasma. E o ELISA (EIE®-LVC) deve ser utilizado como teste confirmatório, utilizando soro ou plasma.

O DPP (Dual Path Platform) é um teste imunocromatográfico, de triagem que utiliza os antígenos K28, K26, K39 (BURNS-JR et al., 1993). O antígeno é impregnado em uma membrana de nitrocelulose. O soro ou o sangue do cão caso ele esteja infectado, terá a presença de anticorpos anti-*Leishmania* que em contato com a membrana, irão interagir com o antígeno presente. Em seguida, o complexo antígeno-anticorpo se liga ao conjugado composto pela proteína A e partículas de ouro coloidal, fornecendo um resultado positivo através da alteração da cor (GRIMALDI et al., 2012). O teste é de rápida execução, o tempo necessário para apresentar o resultado é de 15 minutos, tem baixo custo (ALVAR et al., 2004) e apresenta uma alta confiabilidade (GOMES et al., 2008). Um estudo realizado em Minas Gerais, apresentou uma sensibilidade que variou entre 72 e 77% e especificidade entre 61 e 75% (REITHINGER et al., 2002). Já um outro estudo realizado com um maior número de amostras apresentou melhores resultados, com sensibilidade entre 94 e 96% e especificidade de 100% (COSTA et al., 2003).

O método de ELISA é o mais comumente utilizado por ser um tempo menor de execução, ser de fácil leitura e execução e se adapta a uma grande variedade de antígenos. Este teste pode ser utilizado para um número elevado de amostras, é mais fácil de ser aplicado em estudos de campo (MAIA et al., 2008). É um método quantitativo e permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, apresentando uma baixa precisão na detecção de cães portadores da doença em estágio subclínico e em cães assintomáticos (EVANS et al., 1990). Neste teste os antígenos são impregnados em um suporte de poliestireno. O soro a ser analisado é adicionado e ocorre a incubação. A revelação ocorre por meio de uma anti-imunoglobulina conjugada com uma enzima. Com a adição de um substrato cromógeno, ocorre reação colorida que é medida por espectrofotometria em um determinado comprimento de onda (LAMOTHE et al., 2004).

O ELISA é um teste que apresenta uma maior sensibilidade e menor especificidade se comparado com a Imunofluorescência Indireta (IFI). O método de IFI é considerado um teste de análise qualitativa (MIRÓ et al., 2008). O antígeno utilizado é uma suspensão de promastigotas fixados em uma lâmina em concentrações diferentes. Os anticorpos presentes no soro aderem ao antígeno. O complexo antígeno-anticorpo é revelado por meio de uma anti-imunoglobulina específica para a espécie, acoplada a uma substância fluorescente, por meio da utilização microscopia de fluorescência (LAMOTHE et al., 2004).

A IFI possui menor sensibilidade, apresenta uma maior complexidade na sua execução, dessa forma, necessita de pessoas devidamente treinadas, equipamentos e material específicos. Utiliza equipamentos de alta tecnologia como o microscópio de fluorescência, com isso necessita de um alto custo e não é adequada em larga escala (GONTIJO & MELO, 2004) e de interpretação subjetiva (BOARINO et al., 2008). Uma das principais limitações a técnica é a ocorrência de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos como Leishmaniose Tegumentar (BARROUIN-MELO et al., 2006; FERREIRA et al., 2007; GOMES et al., 2008) e a presença de uma grande janela de detecção nos casos iniciais da doença (BOARINO et al., 2008).

O diagnóstico molecular também pode ser utilizado, com técnicas baseadas na amplificação de ácidos nucleicos, reação de PCR (Polimerase chain reaction) para a identificação do DNA do parasito. Amostras biológicas, tais como aspirados esplênicos, de medula óssea, de linfonodos e sangue total podem ser utilizadas (GONTIJO & MELO, 2004). No caso da LVC, a utilização do sangue como amostra não é muito adequada, pois apesar de apresentar uma coleta mais fácil e menos invasiva, possui uma menor sensibilidade, uma vez que no sangue dos cães infectados a carga parasitaria é muito baixa (FISA, 2001; MANNA et al., 2004). A PCR apresenta uma maior aplicabilidade em estudos epidemiológicos do que no diagnóstico de rotina. Para ser utilizada em larga escala, a PCR necessita de alterações para ser um método mais simples e de menor custo operacional (GONTIJO & MELO, 2004).

## 2.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Os principais avanços em relação a imunopatogênese da leishmaniose estão relacionados aos mecanismos de sobrevivência dos parasitos, através de moléculas envolvidas na interação entre macrófagos e células T e os mecanismos de resistência e

susceptibilidade dos hospedeiros (BOGDAN et.al, 1996). Cães que apresentam a infecção produzem altas concentrações de anticorpos anti-*Leishmania*, (PINELLI et.al, 1994). O curso da infecção está intimamente ligado a imunidade do hospedeiro, a persistência e multiplicação parasitária. O controle da infecção está relacionado a resposta celular, com a capacidade de ativar a atividade microbicida dos macrófagos (GHOSH et al., 2006, PRAJEETH et al., 2011).

Na LVC é observado um aumento dos níveis séricos de anticorpos em cães infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum* (principalmente da classe IgG), entretanto esta resposta não é associada a proteção (PINELLI et al., 1994) e sim a sintomatologia, e consequentemente a presença de parasitos disponíveis (COURTENAY et al., 2002), salientando a importância dos anticorpos IgG anti-*Leishmania* no diagnóstico dos cães infectados. O aumento nos níveis séricos da subclasse IgG1 está relacionado à presença de sinais clínicos dos cães infectados e a gravidade da doença. Os anticorpos da subclasse IgG2 são observados em animais assintomáticos que podem ser resistentes a infecção ou em animais que foram vacinados (DEPLAZES et al., 1995).

A produção da classe IgA, é associada ao elevado parasitismo em diversos tecidos, uma vez que o parasito atinge diversas partes do corpo dentre elas, a mucosa. A classe IgA foi encontrada em altos níveis em cães que sofrem da doença aguda. A imunoglobulina IgM, não se apresenta como um bom marcador de fase aguda (RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007), pois se apresenta de forma mais tardia, após o aparecimento da resposta IgG. Em cães assintomáticos, a presença da resposta IgE foi utilizada como possível marcador ativo da doença (ALMEIDA et al., 2005; INIESTA et al., 2005).

Os cães sintomáticos desenvolvem uma maior produção de níveis de anticorpos específicos, facilmente identificáveis (COURTENAY et al., 2002). Entretanto, nos cães assintomáticos ou em estágio inicial da doença, a detecção dos anticorpos é mais baixa (PINELLI et al., 1994).

Para os cães sintomáticos, a análise de circulação dos linfócitos apresentou baixos níveis de células TCD4<sup>+</sup>. Como indicador de que o indivíduo está em processo de infecção aguda, ocorre a baixa concentração de células B que migram para órgãos linfoides e, dessa forma, há uma redução das células B CD21<sup>+</sup> circulantes. Além disso, também é observado a baixa concentração de linfócitos CD8<sup>+</sup> e uma diminuição de monócitos CD14<sup>+</sup> (REIS et.al., 2010).

Já os cães assintomáticos, a produção de anticorpos é menor, a resposta é fornecida através da proliferação de linfócitos e intradermoreação. Estes animais apresentaram maiores níveis de IL-2 e TNF- $\alpha$  e apresentaram linfócitos, em sua maioria linfócitos CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> que promoveram a lise dos macrófagos infectados. Os macrófagos desempenham um papel fundamental, pois são as células hospedeiras dos parasitos e são importantes na resposta imune (BOGDAN, 1999).

As células do tipo Th1 oferecem proteção ao hospedeiro através da liberação das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e a citocina reguladora IL-12, produzida pelas células dendríticas. O IFN- $\gamma$  secretado pelas células Th1 promove a diferenciação de Th1 e inibe a proliferação das células Th2. A IL-12 contribui no processo de resistência à infecção, indicando que essa citocina tem participação, através da produção de óxido nítrico e conseqüentemente, ocorre a destruição dos parasitos pelos macrófagos. A principal função das Th1 é a defesa mediada por fagócitos, especialmente no combate a micro-organismos intracelulares (ROMÃO, et.al., 2008).

As células do tipo Th2 produzem as citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, as quais são responsáveis por inibir a ativação dos macrófagos e desempenham um papel importante no desenvolvimento da doença (PINELLI et.al, 1994). A IL-4 produzida pelas células Th2 promove a diferenciação das próprias células Th2 e, juntamente com IL-10, inibe a ativação das células Th1. A ativação de células Th2 resulta no aumento da sobrevivência do parasito e na exacerbação das lesões, em razão das ações supressivas de suas citocinas nos macrófagos, assim como o aumento da detecção de anticorpos (FREITAS; PINHEIRO, 2010).

### 2.3 VACINAS CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A resistência aos medicamentos e a alta toxicidade, a maior suscetibilidade à infecção em cães imunodeprimidos e a dificuldade no controle da LVC faz com que a vacinação se estabeleça cada vez mais como uma medida de maior eficácia e segurança no controle da LV tanto para cães como para humanos. A vacinação para humanos ainda não está disponível (PALATNIK-DE-SOUZA, 2008).

A OMS estabelece quatro fases vacinais (I-IV) para a obtenção da autorização para a industrialização e comercialização da vacina. A primeira fase (Fase I), é recomendado a comparação dos indivíduos imunizados daqueles tratados com placebo avaliando a imunogenicidade e segurança vacinal. A segunda fase (Fase II) tem o objetivo de avaliar a

proteção vacinal em uma determinada condição experimental, com isso determina-se a eficácia da vacina nessas condições. A terceira fase (Fase III) testa a eficácia da vacina em áreas de condições naturais que favoreçam a disseminação da doença. Finalmente, se a vacina passou com sucesso pelas etapas anteriores, ela está apta a obtenção do registro e a industrialização, com isso, são realizados os ensaios pertencentes a quarta fase (Fase IV) que consiste em testes com populações de 10000 a 100000 indivíduos. Esta última fase é realizada após a obtenção da autorização de registro (WHO, 2010).

Alguns parâmetros devem ser seguidos para o desenvolvimento de vacinas consideradas ideais no controle da LVC: ter uma pequena quantidade de imunizações necessárias para garantir a proteção do animal a longo prazo, não necessitar de reforço anual e ter relação custo-eficiência viável para a fabricação (COLER; REED, 2005).

A vacinação experimental contra a LVC vem sendo testada há muito tempo, culturas de promastigota de *Leishmania (Leishmania) major* foram utilizadas pela primeira vez na Rússia em 1937 na indução da proteção natural a infecção. Posteriormente foi desenvolvida por Israelenses e usadas em vários testes. Esse processo foi denominado de leishmanização no Uzbequistão (COLER; REED, 2005). A leishmanização foi substituída pelas vacinas de primeira geração que consistem na utilização de parasitos mortos ou vivos atenuados. Estas reproduzem o caminho da infecção, entretanto ainda existem limitações em relação a sua segurança, pois pode ocorrer a reversão da virulência especialmente em animais imunodeprimidos nas vacinas vivas atenuadas (NAGILL; KAUR, 2011).

As vacinas de segunda geração utilizam bactérias ou vírus recombinantes que contêm genes de antígenos de *Leishmania* spp. e frações purificadas (NAGILL; KAUR, 2011). As vacinas de terceira geração são compostas de DNA plasmidial codificante para o antígeno podendo sintetizar as proteínas e aumentar a resposta imune (GRADONI, 2001).

Existem duas vacinas que foram comercializadas para LVC: a Leishmune<sup>®</sup> e a Leish-Tec<sup>®</sup>. A Leishmune<sup>®</sup> é composta pelo antígeno glicoproteico de fucose e manose (FML) de *Leishmania (Leishmania) donovani* e ela foi retirada do mercado por não ter passado nos ensaios de fase III (CAMPOS et al., 2017). A Leish-Tec<sup>®</sup> é a primeira vacina recombinante, produzida pela empresa Hertap Calier Saúde Animal que utiliza o antígeno A2, proteína do estágio amastigota de *Leishmania (Leishmania) donovani* e saponina como adjuvante. Dessas vacinas, a única comercializada atualmente no Brasil é a Leish-Tec<sup>®</sup>, porém ainda faltam ensaios de fase IV. Estudos como o realizado por Grimaldi e colaboradores (2017) demonstrou que 43% dos cães imunizados com a Leish-Tec<sup>®</sup> conseguiram se infectar, isso

quer dizer que a vacina tem efeitos promissores na imunização, mas precisa ser otimizada para as condições de campo em que os cães se encontram constantemente expostos ao desafio natural.

A introdução das vacinas como medida de profilaxia individual contra a LVC trouxe problemas relacionados ao uso do diagnóstico sorológico, pois a presença da alta concentração de anticorpos no sangue dos animais vacinados pode trazer falsos resultados positivos, e gerar um confundimento entre cães infectados e imunizados (SOLANO-GALLEGO et.al, 2017). Essa problemática teve início com a utilização da Leishmune<sup>®</sup> e podem permanecer com o uso da vacina Leish-Tec<sup>®</sup>. Cães imunizados com Leish-Tec<sup>®</sup> demonstraram ter um forte impacto na resposta imune celular, pois apresentam altos níveis de IFN- $\gamma$ , maior produção de anticorpos IgG2, específico ao antígeno vacinal, sugerindo a predominância da resposta imune Th1 (SILVA et.al. 2013). Os anticorpos IgG2 presente nos animais vacinados tem sido correlacionado à opsonização e fixação de complemento que podem gerar a eliminação de amastigotas extracelulares e inibição de sua infecciosidade contribuindo para o perfil de resistência induzido pela vacinação (BOURDOISEAU et al., 2009)

O antígeno que compõe a vacina Leish-Tec<sup>®</sup>, o A2 é um antígeno amastigota, e não se espera que este induza anticorpos de reação cruzada contra o extrato bruto ou solúvel das formas promastigotas usados em testes diagnósticos (DE SOUZA TESTASICCA et al., 2014; FERNANDES et.al., 2008). Contudo, como a Leish-Tec<sup>®</sup> é uma vacina recente, são necessários mais estudos para verificar como essa ferramenta de controle da LVC interfere na resposta imune dos cães e se apresenta alguma alteração nos testes sorológicos preconizados pelo Ministério da Saúde.

### 3. JUSTIFICATIVA

A LV no Brasil apresenta um caráter de negligência e complexidade. Além disso, uma modificação no padrão da doença tem sido observada, deixando de ser predominantemente rural para se tornar urbana. O que a caracteriza como um grave problema de saúde pública. Os cães atuam como reservatórios da doença e são fontes de infecção em áreas urbanas.

A cura parasitológica dessa patologia ainda não foi relatada, logo o desenvolvimento de vacinas profiláticas de utilização preferencialmente em massa se mostra uma alternativa eficaz de controle da doença. Sabe-se que vacinas anti-*Leishmania* em cães já comercializadas no país geravam grande produção de anticorpos protetores que alteravam os resultados obtidos pelo diagnóstico sorológico, preconizado pelo Ministério da Saúde, dificultado o reconhecimento de animais infectados, conseqüentemente tornado o controle da doença um desafio ainda maior.

Por ser uma vacina de utilização recente, a Leish-Tec<sup>®</sup>, já apresenta alguns estudos com esse objetivo, que mostraram, entretanto, resultados discordantes. Por terem sido realizados com poucos animais envolvidos e com acompanhamento por curto período ao longo do protocolo vacinal, se fazem necessários novos estudos no sentido de avaliar o comportamento dessa ferramenta de controle individual, cada vez mais utilizada no país.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil sorológico (soroconversão) dos cães adultos vacinados com a Leish-Tec<sup>®</sup> frente a testes utilizados para o imunodiagnóstico da LVC e testes preconizados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico oficial da doença canina.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar a presença de anticorpos específicos anti- *Leishmania* sp. nos soros de cães vacinados com Leish-Tec<sup>®</sup> frente ao TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC, IFI e ELISA *in house* nos diferentes meses (1 mês, 6 meses, 18 meses, 24 meses) de acompanhamento após protocolo completo de imunização e reforço.
2. Avaliar quais dentre os testes utilizados (TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC, IFI e ELISA *in house*) apresentaram a maior reatividade frente aos soros de animais vacinados com Leish-Tec<sup>®</sup> nos diferentes meses de acompanhamento após protocolo completo de imunização e reforço.
3. Avaliar o perfil de soroconversão nos grupos I, II e III frente aos testes TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC, ELISA *in house* nos diferentes meses de acompanhamento após protocolo completo de imunização e reforço.
4. Avaliar o perfil sorológico de cães vacinados com Leish-Tec<sup>®</sup> frente ao TR-DPP<sup>®</sup> e ao EIE<sup>®</sup>-LVC, preconizados atualmente pelo Ministério da Saúde para o imunodiagnóstico da LVC nos diferentes meses de acompanhamento após protocolo completo de imunização e reforço.
5. Avaliar o perfil sorológico de cães vacinados com Leish-Tec<sup>®</sup> frente ao EIE-LVC<sup>®</sup> e IFI, preconizados pelo Ministério da saúde no passado para o imunodiagnóstico da LVC nos diferentes meses de acompanhamento após protocolo completo de imunização e reforço.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi realizada a avaliação do perfil sorológico (soroconversão) dos cães vacinados com a Leish-Tec<sup>®</sup> frente a testes utilizados para o imunodiagnóstico da LVC e testes preconizados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico oficial da doença canina. Para tal, foram utilizadas amostras de soro de cães participantes do ensaio de campo de fase III realizado por GRIMALDI et al. 2017 (grupo I). Foram utilizados ainda soro de animais naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* de área endêmica região metropolitana de Belo-Horizonte, Minas Gerais (grupo II) e soros de animais não infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* do Rio de Janeiro (grupo III). As amostras de soros do grupo II e grupo III foram utilizadas para obtenção do ponto de corte do ELISA *in house* e para avaliação comparativa com o perfil sorológico dos animais do grupo I. A seleção de amostras foi realizada por critério de conveniência e os ensaios de imunodiagnóstico foram realizados de modo a não desvendar o *status* diagnóstico das amostras, para evitar a ocorrência de viés de classificação.

### 5.2 ASPECTOS ÉTICOS

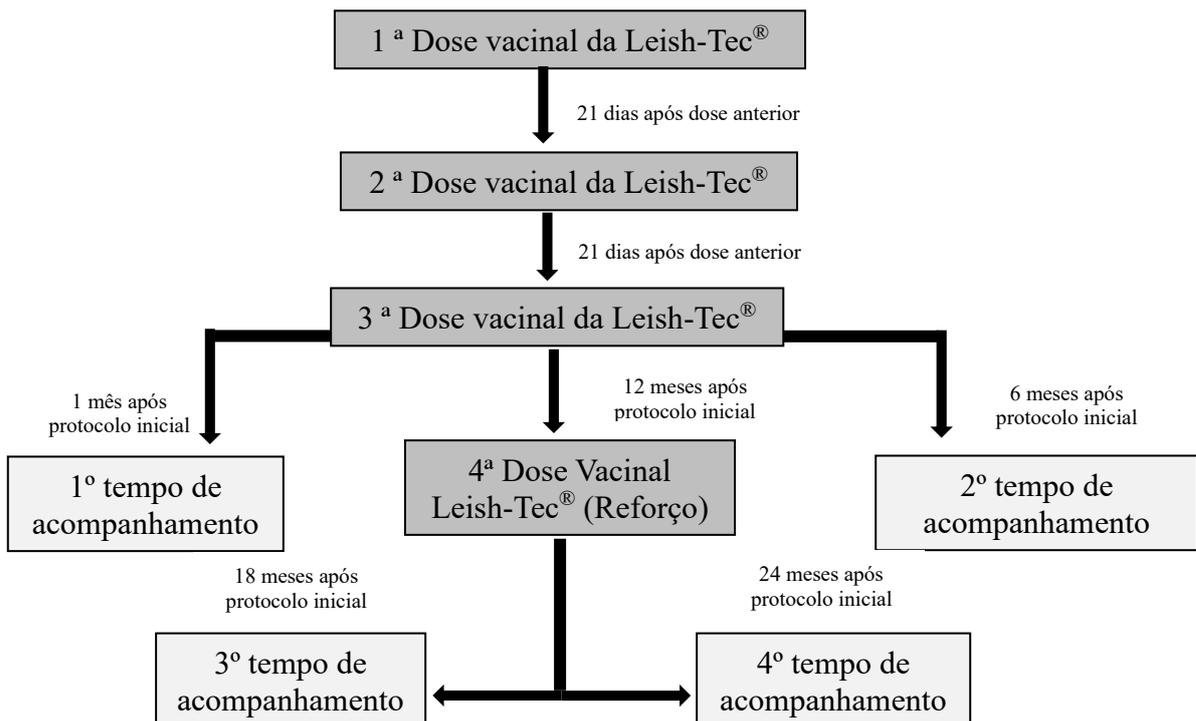
Todas as amostras de soro utilizadas nesse trabalho foram provenientes de banco de soro cedidos gentilmente por equipes colaboradoras. Para esse projeto não foi necessária nova licença da CEUA-Fiocruz, pois os soros doados foram testados dentro dos mesmos objetivos dos estudos anteriores em que foram obtidos. As análises não foram realizadas diretamente no animal vivo, foi utilizado apenas a amostra do soro. Além disso, na ocasião da obtenção (coleta com consequente manipulação dos animais) dos soros foram licenciados para realização da experimentação. grupo I, (licença Ceua-Unesc- 199296/2013), grupos II e III (licença Ceua-Fiocruz -P286/06 e L023/06). Os soros selecionados foram divididos em 3 grupos segundo o Quadro 1.

### 5.3 ESTRATIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

#### 5.3.1 Soro de cães imunizados (grupo I):

Os soros de cães adultos, SRD (sem raça definida), machos e fêmeas imunizados utilizados nesse estudo foram provenientes da região de Pancas – ES, área de alta transmissão para LV, proveniente do estudo realizado por GRIMALDI et al. 2017, um estudo de campo, em que os animais permaneceram sob exposição ao desafio natural ao longo do acompanhamento. Apenas os animais que apresentaram resultado negativo no TR-DPP® no início do estudo de GRIMALDI et al. 2017 foram submetidos ao protocolo de imunização. O período de acompanhamento total dos cães foi de 2 anos após esquema inicial de imunização inicial completo e reforço. As amostras de sangue foram coletadas nos tempos de 1, 6 meses após protocolo de imunização inicial (3 doses iniciais), 18 e 24 meses após o reforço vacinal (4ª dose) realizado 12 meses após o início do protocolo de imunização com a Leish-Tec® como mostra a Figura 5. Os animais permaneceram em ambiente natural (casa dos proprietários).

**Figura 5.** Esquema das doses vacinais do protocolo de imunização com a Leish-Tec® e os períodos de acompanhamento após protocolo de imunização completo.



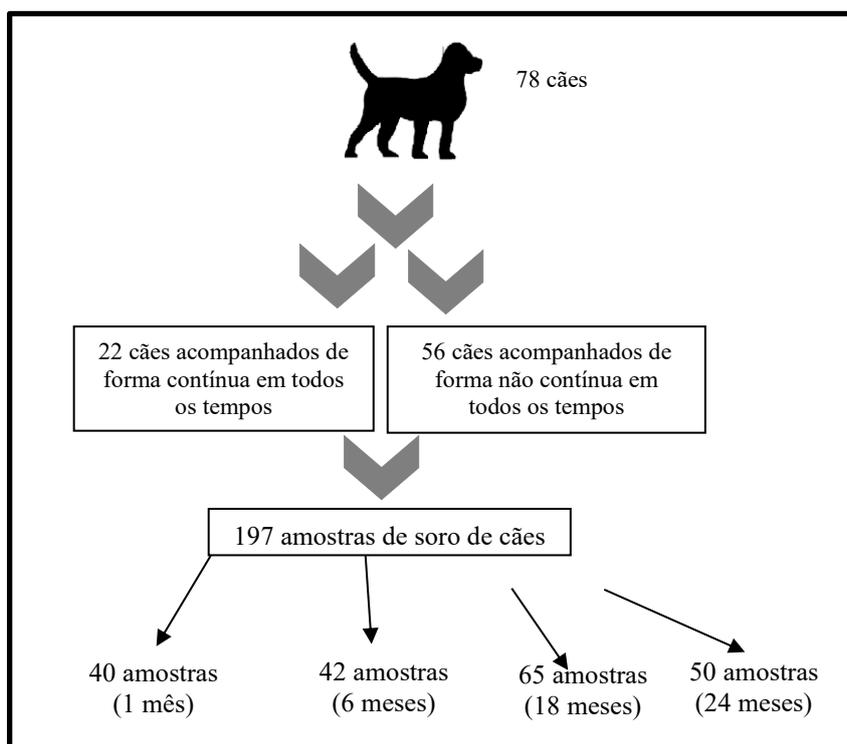
Os animais foram imunizados com a vacina Leish-Tec<sup>®</sup> de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante (protocolo de imunização inicial: 3 doses em um intervalo de 21 dias) e tiveram uma dose de reforço anual (12 meses após ciclo inicial). No trabalho de Grimaldi et al. (2017) foram vacinados 151 cães, entretanto, apenas as amostras de soro de 78 cães foram incluídas no presente estudo, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão apresentados a seguir:

- Critérios de inclusão para este estudo: soro de animais negativos no TR-DPP<sup>®</sup> teste de triagem para a Leishmaniose Visceral Canina no tempo T0 (antes da imunização), e soro de animais que receberam as 4 doses vacinais (protocolo de imunização inicial seguida de reforço anual).
- Critérios de exclusão para este estudo: Animais que não receberam as quatro doses vacinais (3 doses mais o reforço) e animais que morreram ao longo do acompanhamento.

Dos 78 animais estudados, apenas 22 conseguiram ser acompanhados de forma contínua em todos os tempos estudados (1, 6, 18 e 24 meses após o protocolo de imunização inicial), o restante dos cães (56 animais) foram avaliados de forma não contínua nos diferentes tempos do estudo (tendo sido coletadas amostras nos tempos em que isso foi possível). A dificuldade de acompanhamento dos animais estudados está relacionada principalmente ao local em que esses animais residem, região rural onde o controle de entrada e saída desses animais do domicílio é menor, com isso, muitas vezes o animal não é encontrado na visita de retorno ao domicílio para realização do acompanhamento do estudo. A falta de contato com o proprietário e de esclarecimentos por parte do mesmo em colaborar com o estudo são fatores que colaboraram para esse problema.

Foram analisadas 197 amostras de soro dos 78 animais. No primeiro tempo estudado (1 mês), 40 amostras foram analisadas, no segundo tempo (6 meses) 42 no terceiro tempo (18 meses) 65 e no último tempo (24 meses) 50 amostras foram analisadas como mostrado na Figura 6.

**Figura 6.** Quadro representando o número de animais e amostras de soro analisados.



### 5.3.2 Cães Infectados (grupo II)

Os animais infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* foram provenientes da região de Belo Horizonte, região de alta transmissão de LV. Esses animais apresentaram *Leishmania (Leishmania) infantum* avaliadas por meio das técnicas parasitológicas (cultura de fragmento de pele e identificação da espécie por isoenzimas). Foram utilizados 141 animais para compor esse grupo. Essas amostras desse grupo foram usadas como controle verdadeiramente positivos na análise dos dados.

### 5.3.3 Soro de cães do grupo Controle Negativo (grupo III)

Foram selecionados para compor o grupo de animais controle negativos deste estudo, 141 soros de cães aparentemente saudáveis, sem sinais clínicos compatíveis de LV, provenientes da região metropolitana do Rio de Janeiro, área de baixa transmissão (BRASIL, 2014) para a LV. Esses animais não apresentaram *Leishmania (Leishmania) infantum*, avaliadas por meio das técnicas parasitológicas (cultura de fragmento de pele).

Quadro 1. Distribuição das amostras em grupos:

|                  |  |
|------------------|--|
| <b>Grupo I</b>   | Soro de cães apresentaram o TR-DPP® negativos antes da imunização completa que foram vacinados com Leish-Tec® (três injeções subcutâneas no dorso em intervalos de 21 dias) e um reforço 1 ano após o protocolo vacinal inicial, sendo acompanhados posteriormente por 2 anos (GRIMALDI et al., 2017). |
| <b>Grupo II</b>  | Soro de cães infectados de área endêmica região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais – amostras com presença de <i>Leishmania. (Leishmania) infantum</i> por meio de técnicas parasitológicas.  |
| <b>Grupo III</b> | Soro de cães aparentemente saudáveis e não infectados, de área de baixa transmissão, região metropolitana do Rio de Janeiro – amostras sem detecção de <i>Leishmania. (Leishmania) infantum</i> por meio de técnicas parasitológicas.  |

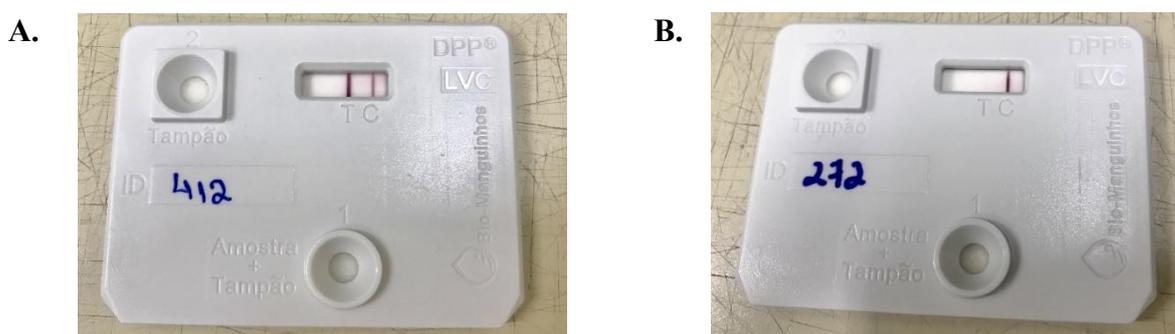
#### 5.4 TESTES DE IMUNODIAGNÓSTICO DA LVC PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL SOROLÓGICO DOS CÃES VACINADOS COM LEISH-TEC®

##### 5.4.1 TR-DPP® Bio-Manguinhos

O teste rápido Dual Platform (DPP) foi realizado seguindo o protocolo obtido do kit DPP-LVC® Bio-Manguinhos. Foi utilizado o volume de 5 µL de amostra dispensado no poço 1, em seguida, utilizando o frasco de tampão na posição vertical foi dispensado 2 gotas de tampão no mesmo poço. Após cinco minutos, no poço 2 foi dispensada quatro gotas de tampão. Após dez minutos, a leitura visual (leitura qualitativa) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante: O aparecimento de duas linhas, a área de controle [C] e a área teste [T] no visor de leitura caracterizou um resultado positivo (Figura 7A). A presença de uma única linha na área [C] foi considerada resultado negativo (Figura 7B) (MANUAL DPP – LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - BIO-MANGUINHOS, 2018). Uma segunda leitura (leitura quantitativa) foi realizada utilizando um leitor eletrônico (leitor de testes

rápidos-M-Bio engenharia, UTPR) capaz de determinar um valor numérico de acordo com a intensidade das linhas presentes na área do visor de leitura. De acordo com as instruções do fabricante, foi considerado positivo valores de [T] maior ou igual a 5,0 e negativos valores menores que 5,0.

**Figura 7.** Resultados obtidos para a amostra 412 e 272, positivo e negativo, respectivamente. (Fonte: Registros fotográficos realizados no dia 9/07/2019)

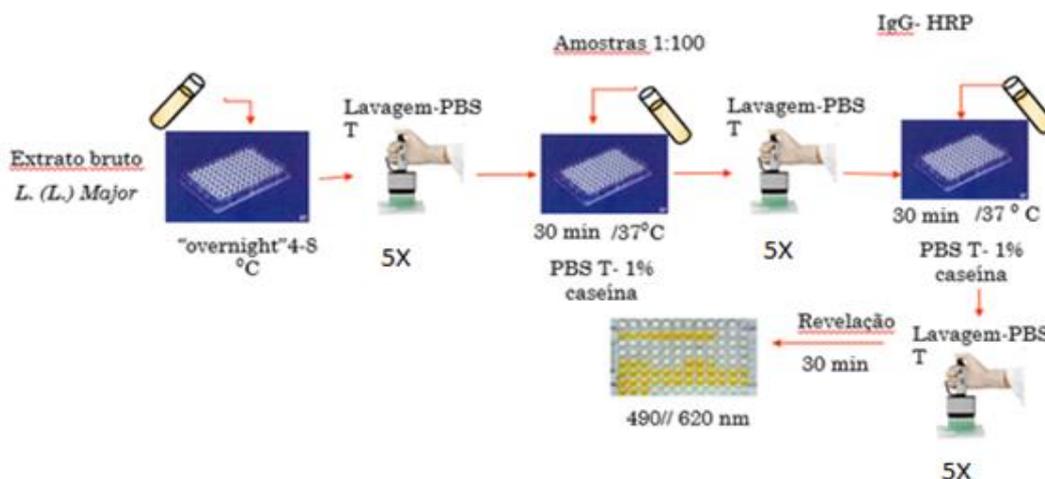


#### 5.4.2 EIE<sup>®</sup>-LVC Bio-Manguinhos

O Teste EIE<sup>®</sup>-LVC Bio-Manguinhos foi realizado seguindo as instruções obtidos no kit. As placas de ELISA foram previamente sensibilizadas pelo fabricante com antígeno bruto de *Leishmania (Leishmania) major*, foi adicionado os soros controles do teste (fornecido pelo kit) e soros de cães testados diluídos 1:100 em solução de bloqueio (fornecida pelo Kit) num volume de 100  $\mu$ L/poço. A incubação em câmara úmida foi feita durante 30 minutos a 37°C e a lavagem foi realizada com tampão de lavagem (fornecida pelo Kit) num volume de 250  $\mu$ L/poço, por cinco vezes com intervalo de 30 segundos entre elas. Em seguida, foi adicionado conjugado (IgG (anti-IgG de cão) fornecido pelo Kit) diluído em solução de bloqueio na concentração 1:100 num volume final de 100  $\mu$ L/poço, seguido de incubação em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. Uma nova lavagem foi realizada, e adicionada solução de revelação num volume de 100  $\mu$ L/poço, conforme descrito na Figura 8. A incubação foi realizada por 30 minutos ao abrigo da luz e para finalização da reação foi adicionado 50  $\mu$ L por poço de solução de parada (fornecida pelo Kit). Para a análise, foi utilizado leitor de microplacas, com filtro de 450 nm para a leitura sem a utilização de filtro de referência (MANUAL EIE – LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - BIO-MANGUINHOS, 2018). O ponto de corte do teste foi estabelecido de acordo com as

instruções do fabricante, composto pela média dos controles negativos somado a 150, valores abaixo desse resultado foram considerados negativos e valores acima, positivos.

**Figura 8.** Esquema do Imunoensaio enzimático EIE – Bio-Manguinhos®



Fonte: Bio-Manguinhos (2018).

#### 5.4.3 ELISA *in house*

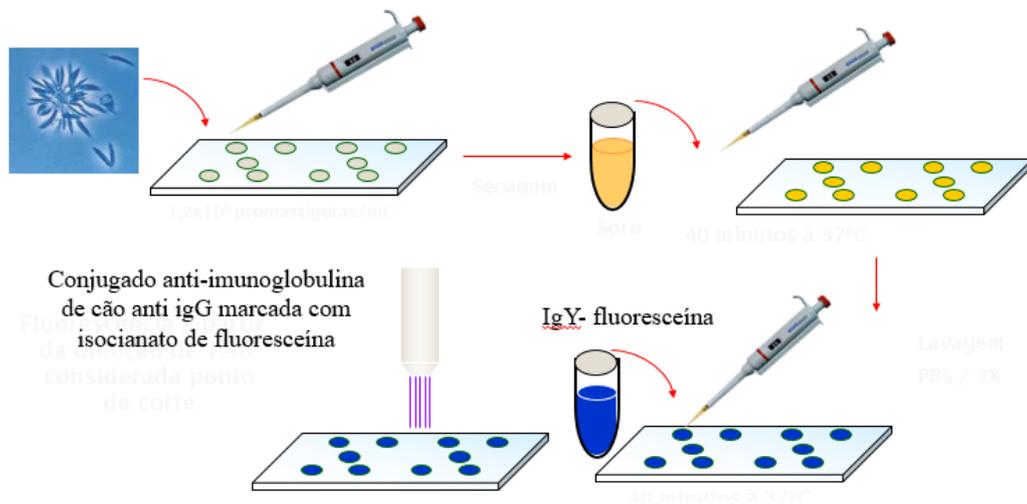
O ELISA *in house* foi executado com modificações dos métodos de Voller et al. (1976); Hommel et al. (1978) e Coutinho et al. (1985). O antígeno utilizado foi *Leishmania (Leishmania) infantum* cultivada segundo Ribeiro et al. (2007). O antígeno foi diluído em tampão bicarbonato (20% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,06M e 80% de NaHCO<sub>3</sub> 0,06M pH 9,6) na concentração de 20 µg/mL, e adicionado o volume de 100 µL/poço. Seguido de incubação *overnight* na temperatura de 4 a 8 °C. A lavagem foi realizada com 300 µL de solução/ poço PBS T (PBS 1X (0,018M, pH 7,6) com 0,05% Tween 20), repetido 3 vezes seguidas. Os soros dos animais testados foram diluídos 1:100 na solução de diluição (PBS T com 1% de caseína) e adicionados na placa no volume de 100 µL/ poço. A incubação foi realizada durante 1 hora em câmara úmida a 37 °C, seguida de nova lavagem conforme descrito anteriormente. Em seguida, foi adicionado o conjugado anti IgG-HRP diluído 1:80000 na solução de diluição num volume 100 µL/ poço. A incubação foi feita por 1 hora em temperatura de 37 °C, seguida do procedimento de lavagem. A revelação do teste foi realizada com TMB (Tetrametilbenzidina- Sigma-Aldrich, USA). Após 30 minutos, a reação

foi paralisada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M 50 µL/ poço e a leitura foi realizada utilizando filtro de 450 nm, sem o uso de filtro de referência. O ponto de corte nesse teste foi de 0,318 obtido por meio da curva ROC obtida pelo programa MedCalc versão 19.1.3.

#### 5.4.4 Imunofluorescência Indireta

O Teste de IFI foi executado segundo Camargo e Rebonato, 1969. As lâminas foram sensibilizadas com promastigota de *Leishmania (Leishmania) infantum*, o conjugado utilizado foi uma anti-imunoglobulina G de cão marcada com isocianato de fluoresceína. O antígeno de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* foi colocado num volume de 10 µL por orifício/lâmina, após as lâminas foram submetidas a secagem por aproximadamente duas horas a 37° C. Os soros (a amostra teste e controles positivos e negativos foram utilizados na concentração de 1:40), foram diluídos em PBS 1X. Foi adicionado 10 µL das diluições por orifício. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, em seguida foram lavadas três vezes em PBS 1X, em cubas de lavagem por 5 minutos, após foi realizada secagem por 10 minutos a 37°C. O conjugado foi diluído em solução de PBS 1X- Azul de Evans 1:10 na concentração 1:75, e foi adicionado 10 µL por orifício, as lâminas foram novamente incubadas a 30 minutos a 37°C, seguido por nova secagem. Foi adicionado de 3 a 4 gotas de glicerina tamponada e lamínula. A leitura foi realizada imediatamente após a realização da técnica utilizando em microscópio de IFI com objetiva de 40X. A Figura 9 mostra o esquema do protocolo de IFI segundo Camargo e Rebonato, 1979. As amostras foram avaliadas por dois diferentes observadores em dois momentos diferentes. As amostras que apresentaram fluorescência na concentração 1:40 foram consideradas positivas e as que não apresentaram fluorescência negativas.

**Figura 9.** Esquema do procedimento do teste de Imunofluorescência Indireta.



Fonte: Camargo e Rebonato (1969).

## 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas realizadas neste trabalho foram conduzidas pelo Programa estatístico SPSS versão 20.0. Foi utilizado os testes Qui-Quadrado com nível de significância de 5% utilizado para a comparação entre as amostras de soro nos diferentes tempos em cada um dos testes realizados, TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC, ELISA *in house* e Imunofluorescência Indireta). O Teste de Kruskal Wallis foi utilizado para comparar os diferentes tempos do grupo I em relação ao grupo II e grupo III, utilizando como parâmetro principal os testes de TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC, ELISA *in house*. Para a análise do ponto de corte do teste ELISA *in house* foi construída a curva ROC através do programa MedCalc versão 19.1.3. Os valores de corte foram estabelecidos escolhendo a melhor relação entre a sensibilidade e especificidade associada à curva ROC. A sensibilidade obtida foi de 98,6 e a especificidade foi de 95,0, o ponto de corte utilizado foi de 0,318.

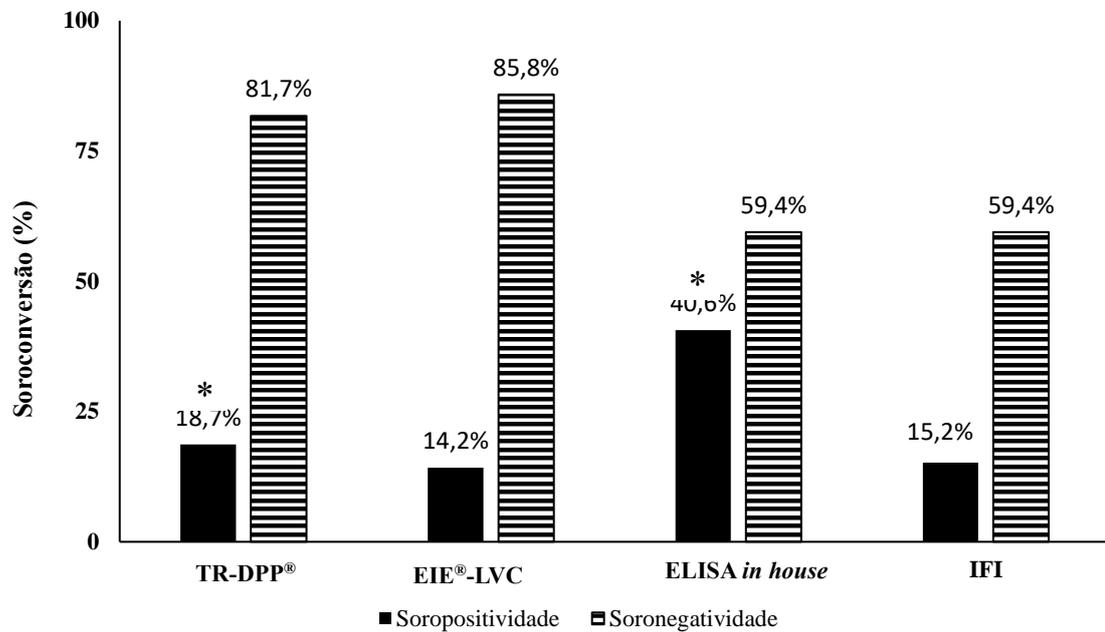
## 6. RESULTADOS

### 6.1 SOROCONVERSÃO DAS AMOSTRAS DE CÃES VACINADOS COM LEISH-TEC<sup>®</sup> (GRUPO I) FRENTE AO TESTE TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC, ELISA *in house* E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA NO PERÍODO TOTAL DE ACOMPANHAMENTO (DE 1 A 24 MESES APÓS O PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO INICIAL).

Para esta avaliação, o critério de análise levado em consideração foi a positividade total das amostras em todos os tempos (1, 6, 18 e 24 meses) frente aos testes a serem avaliados (TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC, ELISA *in house* e IFI). Aqui as amostras de soro foram tratadas como amostras individuais, independente se pertenciam ao mesmo animal ao longo dos tempos avaliados (contabilizadas como amostras únicas, mesmo pertencendo ao mesmo animal nos diferentes tempos). Utilizando TR-DPP<sup>®</sup>, 18,7% (36/197) de todas as amostras soroconverteram e 81,7% (161/197) não soroconverteram. Utilizando o EIE<sup>®</sup>-LVC, 14,21% (28/197) de todas as amostras soroconverteram e 85,8% (169/197) não soroconverteram. Utilizando o ELISA *in house*, 40,60% (80/197) de todas as amostras soroconverteram e 59,4% (117/197) não soroconverteram. Na IFI, 15,2% (30/197) de todas as amostras soroconverteram e 84,8% (167/197) não soroconverteram. A Figura 10 mostra que em todos os tempos de análises o número de animais vacinados que não soroconverteram foi maior que o número de animais vacinados que soroconverteram.

É possível observar que os valores obtidos para a soropositividade das amostras variaram de 14,2 % a 18,7%, para os testes TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC e IFI. Entretanto, somente no teste ELISA *in house* o valor obtido para a soropositividade foi de 40,6%, muito superior aos obtidos nos demais testes. Os testes que detectaram soropositividade significativa ao longo dos tempos de análise foram o ELISA *in house* e o TR-DPP<sup>®</sup> respectivamente ( $p < 0,05$ , Qui-Quadrado).

**Figura 10.** Soroconversão das amostras de cães vacinados com Leish-Tec<sup>®</sup> (grupo I) frente ao teste TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC, ELISA *in house* e IFI durante o período total de acompanhamento após protocolo de imunização inicial.



\*Diferença significativa em relação a detecção da soropositividade de cada teste ao longo dos tempos de estudo ( $p < 0,05$ ).

No mês 1 após o protocolo de imunização inicial, foi detectada uma maior soroconversão utilizando a técnica de IFI, Já no mês 6, 18 e 24 o ELISA *in house* foi a técnica que detectou a maior soropositividade. No mês 1 a soroconversão foi semelhante utilizando as técnicas TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC e ELISA *in house*, no mês 6 a menor soroconversão foi detectada pelo TR-DPP<sup>®</sup>, no mês 18 pela IFI e no mês 24 a menor detecção de soroconversão foi encontrada utilizando EIE<sup>®</sup>-LVC e IFI, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número de amostras positivas no TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC, ELISA *in house* e IFI para o grupo I, nos tempos analisados de 1, 6, 18 e 24 meses após o início do protocolo de imunização.

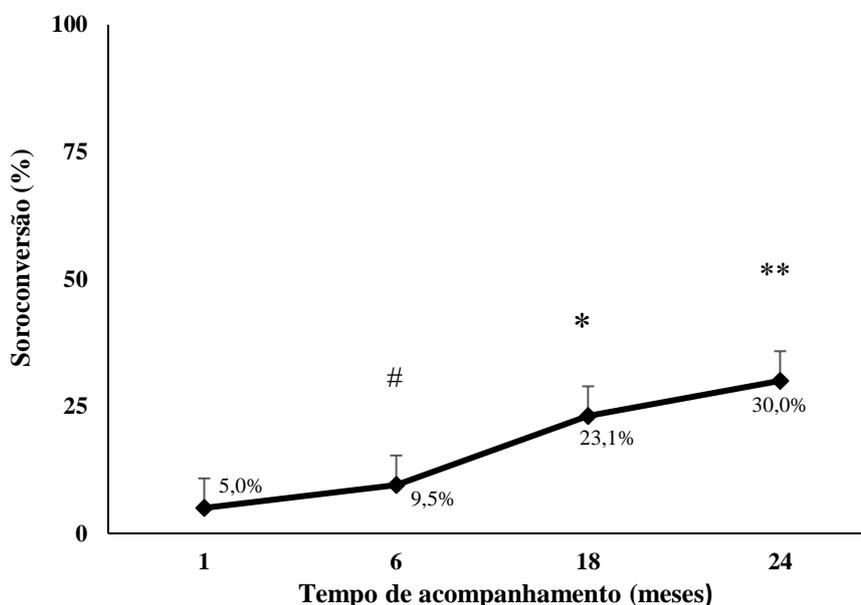
| <b>SOROCONVERSÃO</b>                              |                           |                            |                              |                                    |
|---|---------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| <b>Meses após protocolo de imunização inicial</b> | <b>TR-DPP<sup>®</sup></b> | <b>EIE<sup>®</sup>-LVC</b> | <b>ELISA <i>in house</i></b> | <b>Imunofluorescência indireta</b> |
| <b>1</b>  | 2                         | 2                          | 2                            | 4                                  |
| <b>6</b>  | 4                         | 5                          | 33                           | 6                                  |
| <b>18</b>   | 15                        | 12                         | 22                           | 11                                 |
| <b>24</b>   | 15                        | 9                          | 23                           | 9                                  |
| <b>Total</b>                                      | 36                        | 28                         | 80                           | 30                                 |

#### 6.2 SOROCONVERSÃO DAS AMOSTRAS DE CÃES VACINADOS COM LEISH-TEC<sup>®</sup> (GRUPO I) FRENTE AO TESTE TR-DPP<sup>®</sup> NOS DIFERENTES TEMPOS ANALISADOS (1, 6, 18 E 24 MESES) APÓS O PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO INICIAL.

Para esta avaliação, o critério de análise levado em consideração foi a positividade das amostras em todos os tempos (1, 6, 18 e 24 meses) frente aos testes a serem avaliados (TR-DPP<sup>®</sup>). Aqui as amostras de soro foram tratadas como amostras individuais, independente se pertenciam ao mesmo animal ao longo dos tempos avaliados (contabilizadas como amostras únicas, mesmo pertencendo ao mesmo animal nos diferentes tempos).

Um mês após o protocolo de imunização inicial foi demonstrada uma soroconversão de 5,0% (2/40) das amostras avaliadas, no tempo de 6 meses, esta foi de 9,5% (4/42), em 18 meses a soroconversão foi de 23,1% (15/65) e em 24 meses foi de 30,0% (15/50). Foi demonstrado um perfil crescente da soroconversão frente ao TR-DPP<sup>®</sup>, ao longo dos meses de análise com pico máximo no último mês de análise como mostrado na Figura 11. As maiores e mais significantes soropositividades detectadas ocorreram no mês 18 ( $p < 0,05$ , Teste de Qui-Quadrado) e 24 após protocolo de imunização inicial ( $p < 0,005$ , Teste de Qui-Quadrado).

**Figura 11.** Soroconversão das amostras de cães vacinados com Leish-Tec<sup>®</sup> (grupo I) frente ao teste TR-DPP<sup>®</sup> durante o período total de acompanhamento após protocolo de imunização inicial.



\* Diferença significativa em relação ao mês 1,  $p < 0,05$ .

\*\* Diferença significativa em relação ao mês 1,  $p < 0,005$

# Sem diferença significativa em relação ao mês 1,  $p = 0,432$

### 6.3 SOROCONVERSÃO DAS AMOSTRAS DE CÃES VACINADOS COM LEISH-TEC<sup>®</sup> (GRUPO 1) FRENTE AO TESTE EIE<sup>®</sup>-LVC NOS DIFERENTES TEMPOS ANALISADOS (1, 6, 18 E 24 MESES) APÓS O PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO INICIAL.

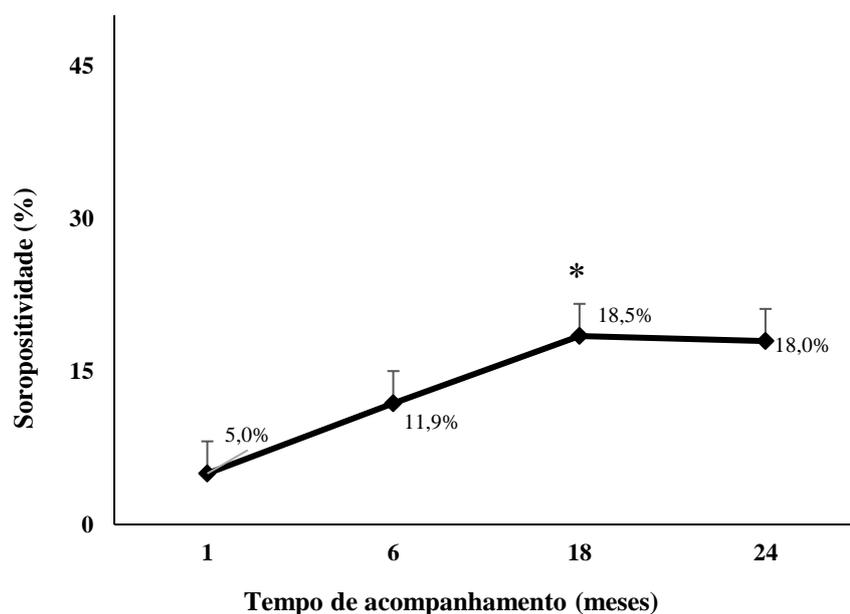
Para esta avaliação, o critério de análise levado em consideração foi a positividade das amostras em todos os tempos (1, 6, 18 e 24 meses) frente aos testes a serem avaliados (EIE<sup>®</sup>-LVC). Aqui as amostras de soro foram tratadas como amostras individuais, independente se pertenciam ao mesmo animal ao longo dos tempos avaliados (contabilizadas como amostras únicas, mesmo pertencendo ao mesmo animal nos diferentes tempos).

A soroconversão frente ao EIE<sup>®</sup>-LVC em todos os tempos analisados, foi demonstrada na figura 11. Um mês após o protocolo de imunização inicial foi demonstrada uma soroconversão de 5,0% (2/40) das amostras avaliadas, no tempo de 6 meses a

oroconversão apresentada foi de 11,9 % (5/42), em 18 meses foi de 20,0% (13/65) e em 24 meses foi de 18,0% (9/50).

Foi demonstrado um perfil crescente da soroconversão frente ao EIE<sup>®</sup>-LVC, ao longo dos meses de análise com aumento a partir do mês 6, com pico máximo significativo aos 18 meses após protocolo de imunização inicial mantendo-se estável até o período final de análise (Figura 12). ( $p < 0,05$ , teste de Qui-quadrado).

**Figura 12.** Soroconversão das amostras de cães vacinados com Leish-Tec<sup>®</sup> (grupo 1) frente ao teste EIE<sup>®</sup>-LVC durante o período total de acompanhamento após protocolo de imunização inicial.



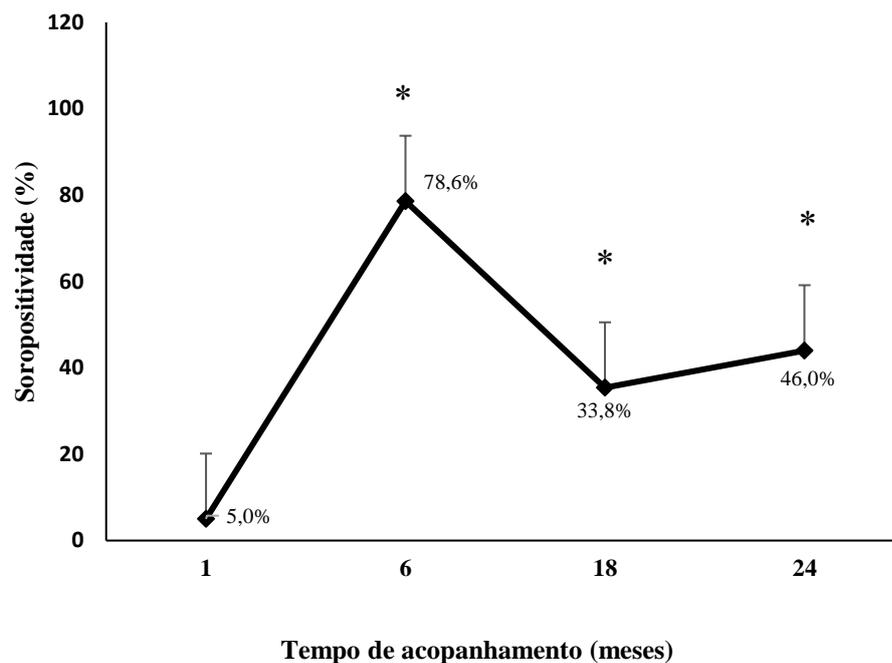
\* Diferença significativa em relação ao mês 1,  $p < 0,05$ .

#### 6.4 SOROCONVERSÃO DAS AMOSTRAS DE CÃES VACINADOS COM LEISH-TEC<sup>®</sup> (GRUPO 1) FRENTE AO TESTE ELISA IN HOUSE NOS DIFERENTES TEMPOS ANALISADOS (1, 6, 18 E 24 MESES) APÓS O PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO INICIAL.

Para esta avaliação, o critério de análise levado em consideração foi a positividade das amostras em todos os tempos (1, 6, 18 e 24 meses) frente aos testes a serem avaliados (ELISA *in house*). Aqui as amostras de soro foram tratadas como amostras individuais, independente se pertenciam ao mesmo animal ao longo dos tempos avaliados (contabilizadas como amostras únicas, mesmo pertencendo ao mesmo animal nos diferentes tempos).

A soroconversão frente ao teste ELISA *in house* em todos os tempos analisados, foi demonstrada na figura 13. Um mês após o protocolo de imunização inicial foi demonstrada uma soroconversão de 5,0% (2/40) das amostras avaliadas, no tempo de 6 meses a soroconversão apresentada foi de 78,6 % (33/42), em 18 meses foi de 33,8% (22/65) e em 24 meses foi de 46,00 % (23/50). Foi demonstrado um pico de soroconversão aos 6 meses após ao protocolo de imunização inicial, com declínio em 18 meses, seguido de um discreto aumento em 24 meses, após reforço (Figura 13). É importante destacar que esses aumentos ocorridos foram significativos quando relacionados ao mês 1. ( $p < 0,05$ , Qui-Quadrado).

**Figura 13.** Soroconversão das amostras de cães vacinados com Leish-Tec<sup>®</sup> (grupo 1) frente ao teste ELISA *in house* durante o período total de acompanhamento após protocolo de imunização inicial.



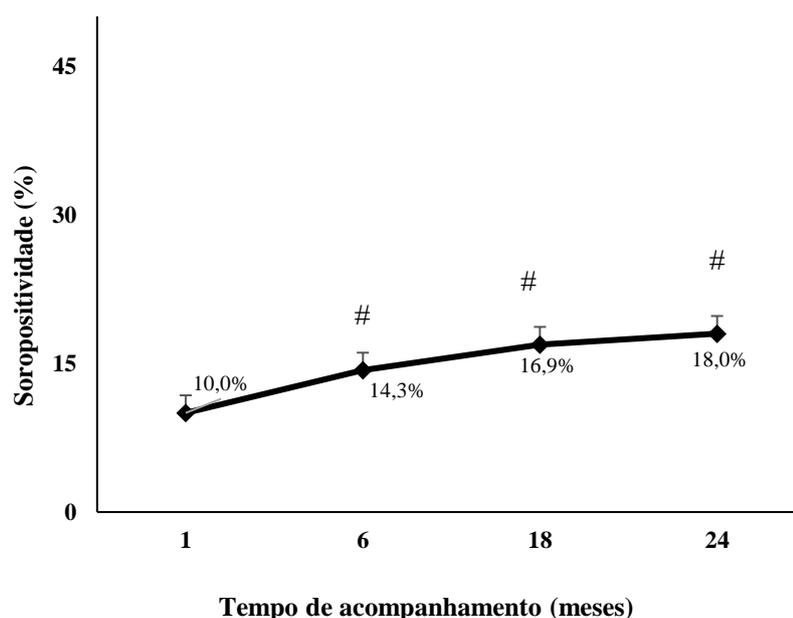
\* Diferença significativa em relação ao mês 1,  $p < 0,05$ .

### 6.5 SOROCONVERSÃO DAS AMOSTRAS DE CÃES VACINADOS COM LEISH-TEC® (GRUPO 1) FRENTE AO TESTE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA NOS DIFERENTES TEMPOS ANALISADOS (1, 6, 18 E 24 MESES) APÓS O PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO INICIAL.

Para esta avaliação, o critério de análise levado em consideração foi a positividade das amostras em todos os tempos (1, 6, 18 e 24 meses) frente aos testes a serem avaliados (IFI). Aqui as amostras de soro foram tratadas como amostras individuais, independente se pertenciam ao mesmo animal ao longo dos tempos avaliados (contabilizadas como amostras únicas, mesmo pertencendo ao mesmo animal nos diferentes tempos).

A soroconversão frente ao teste de IFI em todos os tempos analisados, foi mostrada na Figura 14. Um mês após o protocolo de imunização inicial foi demonstrada uma soropositividade de 10,0% (4/40) das amostras avaliadas, no tempo de 6 meses a soropositividade apresentada foi de 14,3 % (6/42), em 18 meses foi de 16,9% (11/65) e em 24 meses foi de 18,0% (9/50). Foi demonstrado um discreto aumento, não significativo, do primeiro mês de avaliação para o segundo mês e a soropositividade permaneceu estável até o final das avaliações ( $p>0.05$ , Qui-quadrado).

**Figura 14.** Soroconversão das amostras de cães vacinados com Leish-Tec® (grupo 1) frente ao teste IFI durante o período total de acompanhamento após protocolo de imunização inicial



# Sem diferença significativa em relação ao mês 1 ( $p>0.05$ ).

6.6 PERFIL DE SOROCONVERSÃO OBTIDO PELOS ANIMAIS VACINADOS (GRUPO I) EM COMPARAÇÃO AOS INFECTADOS (GRUPO II) E NÃO INFECTADOS (GRUPO III) UTILIZANDO AS TÉCNICAS DE TR-DPP<sup>®</sup>, EIE-LVC<sup>®</sup>, ELISA *IN HOUSE* E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos para os testes TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC e ELISA *in house* nos diferentes tempos de análise (1,6,18 e 24 meses após o protocolo de imunização inicial) e nos diferentes grupos estudados. O intervalo de confiança foi obtido para um nível de confiança de 95%. As médias obtidas para o grupo I em todos os tempos estudados, não apresentaram-se dentro do intervalo de confiança do grupo III, entretanto, as médias obtidas somente para o primeiro tempo de estudo (1 mês) nos testes TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC e ELISA *in house* para as amostras do grupo I (animais vacinados com Leish-Tec<sup>®</sup>) foram as que mais se aproximaram do intervalo de confiança para as amostras do grupo III (animais não infectados), em todos os outros tempos estudados (6, 18, 24) as médias apresentaram-se fora do intervalo de confiança do grupo III e também muito distante do intervalo de confiança do grupo II.

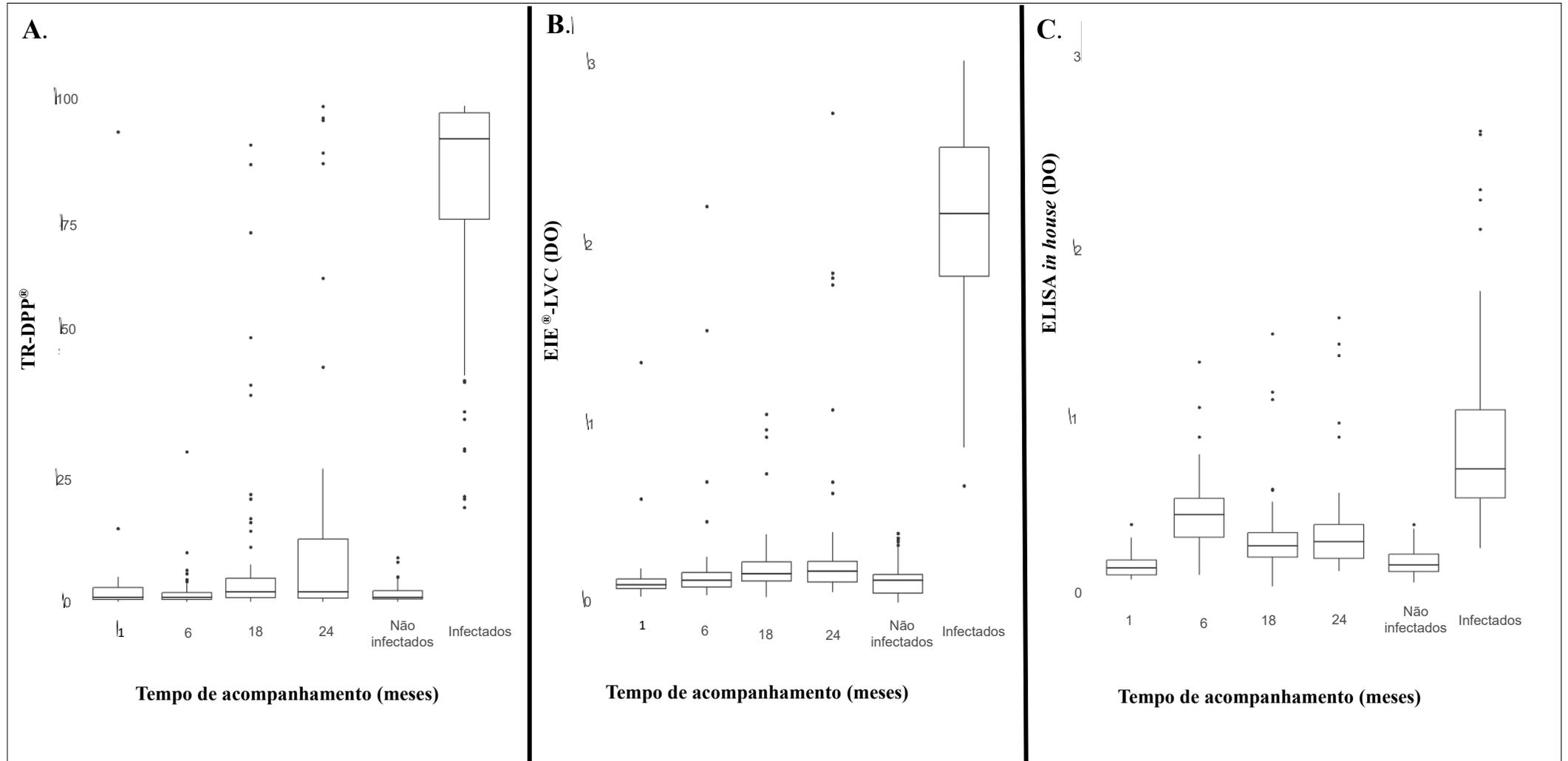
**Tabela 2.** Resultados obtidos pela análise dos soros de animais vacinados, animais infectados e não infectados utilizando as técnicas sorológicas TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC, ELISA *in house*.

| TÉCNICAS SOROLÓGICAS<br>(MÉDIA± INTERVALO DE CONFIANÇA) |       |                     |                            |                            |
|---|-------|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| GRUPOS  | Tempo | TR-DPP <sup>®</sup> | EIE <sup>®</sup> -LVC (DO) | ELISA <i>in house</i> (DO) |
| <b>Grupo I</b>  | 1     | 1,7 (1,35-2,05)     | 0,188 (0,158-0,218)        | 0,165 (0,164-0,166)        |
|   | 6     | 2,2(1,52-2,88)      | 0,264 (0,214-0,314)        | 0,488 (0,485-0,501)        |
|   | 18    | 9,5(6,68-12,32)     | 0,253 (0,250-0,256)        | 0,322 (0,319-0,325)        |
|   | 24    | 14,1 (10,15-18,05)  | 0,390 (0,320-0,460)        | 0,391(0,286-0,396)         |
| <b>Grupo II</b>   | -     | 83,0 (79,71-86,29)  | 2,10 (2,02-2,18)           | 0,876 (0,796-0,956)        |
| <b>Grupo III</b>  | -     | 1,4 (1,19-1,62)     | 0,166 (0,165-0,167)        | 0,188 ± 0,0                |

A Figura 15 apresenta o perfil da dispersão das amostras obtidas em cada tempo estudado (1,6,18 e 24 meses após o protocolo de imunização inicial) no TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup> - LVC e ELISA *in house*. A Figura 15.A demonstra os resultados obtidos para as amostras do Grupo I, II e III no teste TR-DPP<sup>®</sup>. Além disso, é possível observar que no tempo de 24 meses, as amostras apresentaram uma maior variabilidade e um maior desvio padrão, e no tempo de 1 e 6 meses, as amostras apresentaram uma menor variabilidade e um menor desvio padrão. A dispersão das amostras nos tempos de 1 e 6 meses, nesse caso, são as que mais se aproximam do padrão de dispersão dos animais não infectados, não apresentando diferença significativa ( $p > 0,05$ , Kruskal Wallis). A Figura 15.B demonstra os resultados obtidos no teste EIE<sup>®</sup>-LVC para as amostras do Grupo I. Nesse caso, o padrão de dispersão se manteve homogêneo ao longo dos meses, todos os tempos analisados tiveram padrão próximo ao grupo III (não infectados), não apresentando diferença significativa ( $p > 0,05$ , Kruskal Wallis).

A Figura 15.C demonstra os resultados obtidos no teste ELISA *in house* para as amostras do Grupo I. O ELISA *in house* foi o único teste que apresentou uma diferença significativa entre as médias no segundo tempo avaliado (6 meses após o protocolo de imunização inicial) em relação ao primeiro tempo (1 mês) ( $p < 0,05$ , Kruskal Wallis). O padrão de dispersão das amostras no mês 1 após protocolo de imunização inicial foi muito semelhante ao grupo III ( $p > 0,05$ , Kruskal Wallis), entretanto, nos tempos de 6, 18 e 24 meses após o protocolo de imunização inicial o padrão de dispersão foi diferente e não apresentou-se semelhante ao grupo III ( $p < 0,05$ , Kruskal Wallis).

O padrão de dispersão das amostras do grupo I em todos os tempos estudados, tanto para o TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC, ELISA *in house* não se aproximaram do padrão de dispersão do grupo II (infectados) ( $p < 0,05$ , Kruskal Wallis)



**Figura 15.** Box-plot dos resultados obtidos para o TR-DPP® (A), EIE®-LVC (B) E ELISA *in house* (C) para as amostras do grupo 1, grupo 2 (infectados) e grupo 3 (não infectados).

## 6.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SOROCONVERSÃO PARA OS CÃES ACOMPANHADOS EM TODOS OS TEMPOS DE ANÁLISE APÓS PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO INICIAL.

Dentre os 78 animais estudados, em 22 foi possível a coleta de amostras de soro em todos os tempos avaliados após o protocolo de imunização inicial. Desses 22 animais, somente 1 (VSLC14) não apresentou soropositividade nos testes avaliados em todos os tempos. Em 21 animais foi encontrada algum ponto de soropositividade em pelo menos dos 1 testes avaliados em todos os tempos analisados. Vinte animais soroconverteram utilizando o ELISA *in house*, onze animais soroconverteram quando o TR-DPP<sup>®</sup> foi avaliado, 10 animais soroconverteram utilizando a IFI e 9 animais soroconverteram utilizando o EIE<sup>®</sup>-LVC (Tabela 3).

Em relação aos 22 animais que apresentaram acompanhamento em todos os tempos, 7 animais apresentaram soropositividade em todos os testes estudados TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC, ELISA *in house* e IFI. Sete animais em apenas 1 teste (6 apresentaram soropositividade somente no ELISA *in house* e 1 animal no TR-DPP<sup>®</sup>). Cinco em 2 testes (2 para TR-DPP<sup>®</sup> e ELISA *in house* e 3 para IFI e ELISA *in house*). Três animais apresentaram soropositividade em 3 testes (2 no TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC e ELISA *in house* e 1 no IFI, EIE<sup>®</sup>-LVC e ELISA *in house*).

Em relação ao tempo de acompanhamento após protocolo de imunização inicial, o tempo de 24 meses foi o que mais demonstrou soroconversão quando se levou em consideração os testes de TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC e IFI, entretanto, quando se levou em consideração o ELISA *in house*, o tempo de 6 meses após protocolo de imunização inicial foi o que demonstrou maior soropositividade. Em todos os tempos analisados quando relacionados aos testes de TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC e IFI alguma soroconversão foi detectada. Somente utilizando o ELISA *in house*, no mês 1 após o protocolo de imunização inicial nenhuma soroconversão foi detectada (Tabela 3).

**Tabela 3.** Soropositividade obtida para os animais que apresentaram o período de acompanhamento completo do estudo (24 meses após o protocolo de imunização inicial).

| TESTES              |                      |          |          |          |                       |          |          |          |                             |          |          |          |                       |           |           |           |
|---------------------|----------------------|----------|----------|----------|-----------------------|----------|----------|----------|-----------------------------|----------|----------|----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|
| Animais             | TR <sup>®</sup> -DPP |          |          |          | EIE <sup>®</sup> -LVC |          |          |          | Imunofluorescência indireta |          |          |          | ELISA <i>in house</i> |           |           |           |
|                     | 1                    | 6        | 18       | 24       | 1                     | 6        | 18       | 24       | 1                           | 6        | 18       | 24       | 1                     | 6         | 18        | 24        |
| (VUC01)             | -                    | -        | -        | -        | -                     | -        | -        | -        | +                           | -        | -        | -        | -                     | -         | -         | +         |
| (VUC06)             | -                    | -        | -        | -        | -                     | -        | -        | -        | -                           | -        | -        | -        | -                     | +         | +         | -         |
| (VUC15)             | +                    | -        | -        | -        | +                     | -        | -        | -        | +                           | -        | -        | -        | -                     | +         | +         | +         |
| (VUC16)             | -                    | -        | -        | -        | -                     | -        | -        | -        | -                           | -        | -        | -        | -                     | +         | -         | -         |
| (VUC20)             | -                    | -        | +        | +        | -                     | -        | -        | +        | -                           | -        | -        | +        | -                     | +         | +         | +         |
| (VUC21)             | -                    | -        | -        | -        | -                     | -        | -        | -        | -                           | -        | -        | -        | -                     | +         | +         | +         |
| (VRC04)             | -                    | -        | -        | -        | -                     | -        | +        | -        | -                           | -        | +        | -        | -                     | +         | -         | -         |
| (VRC05)             | -                    | -        | +        | +        | -                     | -        | -        | +        | -                           | -        | -        | +        | -                     | +         | +         | +         |
| (VRC13)             | -                    | +        | -        | +        | -                     | +        | -        | -        | -                           | +        | -        | -        | -                     | +         | +         | +         |
| (VRC16)             | -                    | -        | -        | -        | -                     | -        | -        | -        | -                           | -        | -        | +        | -                     | +         | -         | -         |
| (VRC17)             | -                    | -        | -        | +        | -                     | -        | -        | -        | -                           | -        | -        | -        | -                     | -         | -         | -         |
| (VRC23)             | -                    | -        | +        | -        | -                     | -        | -        | -        | -                           | -        | -        | -        | -                     | +         | -         | +         |
| (VRC35)             | -                    | -        | +        | +        | -                     | -        | -        | +        | -                           | -        | -        | -        | -                     | +         | -         | +         |
| (VRC36)             | -                    | -        | -        | -        | -                     | -        | -        | -        | -                           | -        | -        | -        | -                     | +         | +         | -         |
| (VRC37)             | -                    | -        | -        | -        | -                     | -        | -        | -        | -                           | -        | -        | -        | -                     | -         | +         | -         |
| (VRC40)             | -                    | -        | -        | +        | -                     | -        | -        | +        | -                           | -        | -        | +        | -                     | +         | -         | +         |
| (VRC 66)            | -                    | -        | -        | +        | -                     | -        | -        | +        | -                           | -        | -        | -        | -                     | +         | +         | +         |
| (VRC 67)            | -                    | -        | -        | -        | -                     | -        | -        | -        | -                           | -        | -        | +        | -                     | -         | -         | +         |
| (VRC68)             | -                    | -        | +        | +        | -                     | -        | -        | -        | -                           | -        | -        | -        | -                     | +         | +         | +         |
| (VSLC01)            | -                    | -        | -        | +        | -                     | -        | -        | +        | -                           | -        | +        | +        | -                     | +         | -         | +         |
| (VSLC14)            | -                    | -        | -        | -        | -                     | -        | -        | -        | -                           | -        | -        | -        | -                     | -         | -         | -         |
| (VSLC31)            | -                    | -        | -        | -        | -                     | -        | -        | -        | -                           | -        | -        | -        | -                     | +         | -         | +         |
| <b>TOTAL (n=22)</b> | <b>1</b>             | <b>1</b> | <b>5</b> | <b>9</b> | <b>1</b>              | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>6</b> | <b>2</b>                    | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>6</b> | <b>0</b>              | <b>17</b> | <b>10</b> | <b>14</b> |

## 6.8 COMPARAÇÃO CENÁRIO ATUAL EM RELAÇÃO AO CENÁRIO ANTIGO PRECONIZADO PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE.

Os resultados deste estudo mostraram que utilizando como critério de análise o cenário atual de diagnóstico da LVC preconizado pelo Ministério da saúde (TR-DPP<sup>®</sup> como triagem e EIE<sup>®</sup>-LVC Bio-Manguinhos como confirmatório), 7,6% (15/197) das amostras analisadas demonstraram soropositividade. Utilizando o cenário antigo como critério de análise (EIE<sup>®</sup>-LVC Bio-Manguinhos como triagem e IFI como confirmatório), foi observada uma soropositividade de 11,7% (23/197) das amostras analisadas, comparando os dois cenários, o antigo foi o que mais detectou positividade, entretanto, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa quando relacionado com o cenário atual. ( $p > 0,05$ , Qui-quadrado).

No cenário atual, no tempo 1 e 6 meses somente 1 animal soroconverteu, no tempo de 18 meses, 5 animais soroconverteram e no tempo 24 meses 8 animais soroconverteram. No cenário antigo, no tempo de 1 mês, apenas 1 animal soroconverteu, no tempo de 6 meses, 5 animais soroconverteram, no tempo de 18 meses, 9 animais soroconverteram e no tempo de 24 meses, 6 animais soroconverteram. No cenário novo, o tempo que obteve uma maior soroconversão foi o de 24 meses, já no cenário antigo, foi o tempo de 18 meses (Tabela 4).

Considerando os animais acompanhados em todos os tempos de análise após protocolo de imunização inicial foram diagnosticados como positivos 8 animais segundo o cenário atual preconizado pelo Ministério da Saúde. Em relação ao cenário antigo, 7 animais apresentaram soroconversão no EIE<sup>®</sup>-LVC como triagem e IFI como teste confirmatório (Tabela 3).

**Tabela 4.** Resultados obtidos para cada cenário preconizado pelo Ministério da Saúde, cenário atual composto pelo TR-DPP® como triagem e EIE®-LVC como confirmatório e cenário antigo composto pelo EIE®-LVC como triagem e IFI como confirmatório.

| <b>ANIMAIS SORO REATORES SEGUNDO OS CENÁRIOS DE DIANÓSTICO</b>     |                      |          |          |                         |
|--|----------------------|----------|----------|-------------------------|
| <b>Cenários</b>  | <b>Tempo (meses)</b> | <b>n</b> | <b>%</b> | <b>Total de animais</b> |
| <b>Atual<br/>(TR-DPP® e EIE®-LVC)</b>                              | 1                    | 1        | 2,5      | 40                      |
|  | 6                    | 1        | 2,4      | 42                      |
|  | 18                   | 5        | 7,7      | 65                      |
|  | 24                   | 8        | 16,3     | 49                      |
| <b>Antigo<br/>(EIE®-LVC e<br/>Imunofluorescência<br/>indireta)</b> | 1                    | 1        | 2,3      | 40                      |
|  | 6                    | 5        | 11,9     | 42                      |
|  | 18                   | 9        | 13,8     | 65                      |
|  | 24                   | 6        | 14,0     | 50                      |

## 7 DISCUSSÃO

O programa de controle da Leishmaniose Visceral Canina disponível prioriza o tratamento dos casos humanos, controle vetorial e a eutanásia dos cães soropositivos para a doença. Os cães que são diagnosticados como positivos segundo o protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde (TR-DPP<sup>®</sup> utilizado na triagem dos reservatórios e EIE<sup>®</sup>-LVC como confirmatório (BRASIL, 2011)), necessitam ser eutanasiados. Dessa forma, é necessário que os métodos de diagnóstico apresentem uma alta confiabilidade para identificação dos animais soropositivos (ALVAR et.al., 2004). A cura parasitológica da LVC ainda não foi descrita na literatura, entretanto vem-se adotando medidas de profilaxia que possam ser eficazes para a prevenção da LVC, dentre outras, se encontra a vacinação (PALATNIK-DE-SOUZA, 2008). A única vacina atualmente comercializada no Brasil é a Leish-Tec<sup>®</sup>, estabelecida como uma medida de profilaxia individual. Entretanto, animais imunizados apresentam uma alta produção de imunoglobulinas, principalmente do tipo IgG e esses anticorpos podem soropositivar com os testes preconizados pelo Ministério da Saúde no imunodiagnóstico da LVC, levando a um confundimento entre animais vacinados e infectados, o que dificulta e provoca discussão sobre um controle mais eficaz da doença.

É importante dizer que as amostras dos animais neste trabalho foram colhidas já após o protocolo de imunização inicial completo, ou seja, após as 3 doses, com intervalo de 21 dias e com reforço após 1 ano após ciclo de imunização inicial. Outros trabalhos utilizaram amostras mais precoces, entre as doses do protocolo de imunização inicial (MARCONDES, et.al, 2013; FERNANDES et.al., 2014).

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que ocorreu reatividade cruzada ao longo dos meses após o esquema de imunização completo com a Leish-Tec<sup>®</sup> em todos os testes utilizados no imunodiagnóstico da LVC. Entretanto, a detecção de amostras positivas foi muito menor frente a quantidade de amostras negativas identificadas. Conforme descrito nos trabalhos, Campos et.al (2017) identificou que apenas um animal (1/12) soroconverteu no TR-DPP<sup>®</sup> no tempo de 6 meses após o protocolo de imunização inicial com Leish-Tec<sup>®</sup>, 11 apresentaram-se negativos. Este animal foi negativo no teste confirmatório EIE<sup>®</sup>-LVC, no PCR e após um ano, apresentou-se negativo no TR-DPP<sup>®</sup>. Testasticca et.al. (2014) demonstrou que 1 animal imunizado com Leish-Tec<sup>®</sup> soroconverteu no ELISA (*Leishmania Promastigote Antigen* - LPA) representando 1,42% (1/70) e 98,58% apresentaram resultados negativos, e no TR-DPP<sup>®</sup> um animal apresentou soroconversão em um total de 70 animais, as demais amostras apresentaram resultados negativos. Fernandes

et.al. (2014) mostrou uma soroconversão de 30,9% (13/42) no 11º mês de seguimento após o início do protocolo de imunização com a Leish-Tec® no ELISA (LPA) e 69,1% apresentaram resultados negativos. Palatnik-De-Souza et.al. (2009) demonstrou que 1,3% (76/5860) de animais vacinados com Leishmune® foram positivos no EIE®-LVC e confirmados na IFI no período de 2007 em Campo Grande - MS. Todos esses estudos foram conduzidos em área endêmica para LVC, exceto o estudo de Campos et. al. (2017) que foi conduzido no Rio de Janeiro, área considerada não endêmica para a doença (BRASIL, 2014a).

Neste estudo o teste que demonstrou uma maior porcentagem de soroconversão foi o ELISA *in house* ao longo dos meses de acompanhamento ( $p < 0,05$ ), seguido do TR-DPP® ( $p < 0,05$ ), teste utilizado na triagem dos reservatórios, IFI e por último o EIE®-LVC (teste confirmatório no diagnóstico da LVC). Esses resultados concordam com o padrão observado por Marcondes et.al. 2013, o qual apresentou uma maior porcentagem de soropositividade para o ELISA *in house* na análise de 18 cães negativos para *Leishmania (Leishmania) infantum* imunizados com Leishmune®. Entretanto, o trabalho desenvolvido por Marcondes apresentou o EIE®-LVC com a segunda maior soropositividade, seguida da IFI e TR-DPP®, discordando do achado nesse projeto.

Na literatura existem estudos que demonstram o ELISA *in house* como um teste que possui um alto índice de soropositividade. Da Silva e colaboradores (2013) e Ribeiro e colaboradores (2011) analisaram o comportamento do ensaio Imunoenzimático (ELISA) utilizando antígenos homólogo e heterólogo *Leishmania (Leishmania) chagasi* e *Leishmania (Leishmania) major*. Fatores como o tempo de incubação e a marca das microplacas utilizadas podem interferir na sensibilidade e especificidade do teste (REITHINGER, et.al., 2002), provavelmente por influenciar as interações de antígeno e anticorpo. O ELISA que utiliza o antígeno homólogo, *Leishmania (Leishmania) infantum*, apresentou uma maior sensibilidade (100%) e maior especificidade (92%). Esse achado demonstra a maior eficácia na detecção de amostras positivas para *Leishmania (Leishmania) infantum* utilizando o teste ELISA *in house* e salienta que o alto valor de soroconversão encontrado neste estudo pode estar relacionado ao fato do ELISA *in house* possuir uma maior especificidade e sensibilidade por utilizar o antígeno de *Leishmania (Leishmania) infantum*, responsável por causar a Leishmaniose Visceral no Brasil.

Considerando o padrão observado em cada teste estudado, o TR-DPP® demonstrou que a soroconversão foi crescente ao longo dos meses de acompanhamento, apresentando

significância estatística nos tempos de 18 e 24 meses ( $p < 0.05$ ). Resultados diferentes foram encontrados em um estudo desenvolvido por Testasticca et.al. (2014), onde foi encontrado soroconversão para o TR-DPP<sup>®</sup> em apenas um animal imunizado com Leish-Tec<sup>®</sup> ao longo dos 14 meses após o protocolo de imunização. Campos et.al. (2017) encontrou soroconversão em apenas 1 animal (1/12) no tempo de 6 meses após o protocolo com Leish-Tec<sup>®</sup> e após 1 ano o animal apresentou-se negativo. No estudo desenvolvido por Marcondes 2013, os resultados apresentados para o TR-DPP<sup>®</sup> 42 dias após a primeira dose 5,5% (1/18) dos animais soroconverteram, 90 dias após a primeira dose da Leishmune<sup>®</sup> 33,3% (6/18) e 6 meses 11,1% (2/18). Foi demonstrado que a soroconversão aumentou até o período de 3 meses após a primeira dose, atingiu seu valor máximo neste período e depois diminuiu no tempo de 6 meses.

Nesse trabalho, foi observado para o teste EIE<sup>®</sup>-LVC um aumento da soropositividade no período de 1 mês aos 18 meses de acompanhamento após o protocolo de imunização inicial e uma estabilização da soroconversão no último tempo (24 meses após o protocolo de imunização inicial) com diferença significativa apenas no tempo de 18 meses ( $p < 0.05$ ). O estudo desenvolvido por Marcondes (2013) demonstrou que o teste EIE<sup>®</sup>-LVC, 42 dias após a primeira dose da vacina Leishmune<sup>®</sup> apresentou 11,1% de soroconversão (2/18), 90 dias após a primeira dose 83,3% (15/18) de soroconversão e 6 meses após a primeira dose apresentou 33% (6/18) de soroconversão. Estes resultados encontrados são diferentes dos obtidos no presente trabalho em que a soroconversão é crescente ao longo dos meses de acompanhamento e estabiliza-se no tempo de 24 meses, podendo estar relacionado ao desafio natural, uma vez que o animal em área endêmica continua sendo desafiado e respondendo a infecção natural que gera uma resposta diversa. Por isso, foi demonstrado uma resposta imune crescente com a soroconversão num período mais distante do momento vacinal.

A IFI foi o teste que apresentou um perfil crescente e não apresentou significância estatística ao longo dos meses em relação ao primeiro mês 1 ( $p > 0,05$ ). Um estudo desempenhado por Araújo et.al., (2009) demonstrou que a IFI obteve uma soroconversão de 19,3% (12/62) em animais imunizados com Leishmune<sup>®</sup>. Já o trabalho desenvolvido Marcondes et.al. (2013) o comportamento da IFI foi apresentado em diferentes tempos de acompanhamento, 21 dias após a primeira dose da vacina Leishmune<sup>®</sup> foi obtida uma soroconversão de 1/18 (5,5%), 42 dias após a soroconversão foi de 83,3% (15/18), 90 dias após a soroconversão foi de 13/18 (72,2%) e em 6 meses foi de 5,5% (1/18). Houve um

aumento da soroconversão ao longo do tempo de acompanhamento, diferente do que ocorreu em nosso trabalho, onde a resposta foi linear durante todo período de avaliação. É importante lembrar que estes trabalhos apresentaram reatividade entre o protocolo de imunização inicial. No nosso trabalho, essa reatividade foi tardia, após o protocolo de imunização inicial até 24 meses, podendo estar associado a permanência e possivelmente a resposta imune frente ao desafio natural no decorrer do tempo na área endêmica.

No ELISA *in house* o padrão apresentado foi diferente dos testes mencionados anteriormente, o pico de produção de anticorpos ocorreu apenas 6 meses após o protocolo de imunização inicial. No tempo de 18 meses houve um decréscimo da soropositividade e no tempo seguinte, 24 meses, houve um pequeno aumento. Fernandes e colaboradores (2014), descreveram o comportamento sorológico das vacinas Leishmune<sup>®</sup> e Leish-Tec<sup>®</sup> por meio da avaliação de 180 cães negativos para *Leishmania (Leishmania) infantum* no ensaio Imunoenzimático ELISA *in house*, que receberam protocolo de imunização com 3 doses das vacinas Leish-Tec<sup>®</sup> e Leishmune<sup>®</sup> e foram acompanhados por 11 meses desde o início do protocolo vacinal. A porcentagem de soroconversão no ELISA *in house* no grupo Leishmune<sup>®</sup> foi de 57,5% (23/40) e no grupo para Leish-Tec<sup>®</sup> foi 59,5% (25/42) no período de 21 dias após a primeira dose vacinal. Já no tempo de 42 dias após a primeira dose, 77,5% (31/40) das amostras soroconverteram para o grupo de Leishmune<sup>®</sup> e 54,8% (23/42) para o grupo Leish-Tec<sup>®</sup>. Esta reatividade foi mantida até 21 dias após o protocolo de imunização completo. Na última avaliação realizada no 11<sup>o</sup> mês de seguimento, foi obtida uma soroconversão de 32,5% (13/40) dos cães imunizados com Leishmune<sup>®</sup> e 30,9% (13/42) dos cães vacinados com a Leish-Tec<sup>®</sup>. Segundo Fernandes et.al, 2014, os valores de soroconversão obtidos ao final do acompanhamento de 32,5% e 30,9% estão dentro da faixa de resultados de soropositividade relatados por outros autores em cães na mesma área endêmica durante o mesmo período. Marcondes (2013) também avaliou o comportamento do Elisa *in house* frente a imunização com Leishmune<sup>®</sup> e 21 dias após a primeira dose (9/18) (50%) cães eram soropositivos pelo ELISA *in house*, 42 dias 100% (18/18), 90 dias após a primeira dose, 18/18 (100%), foram positivos para *Leishmania* spp. pelo ELISA *in house* e 6 meses após a primeira dose, 16/18 (88,8%).

Os valores obtidos para a soroconversão no ELISA *in house* neste trabalho estão de acordo com o que já foi descrito na literatura. No estudo observado por Fernandes (2014) o ELISA *in house* apresentou um pico de soroconversão (77.5%) no tempo de 42 dias após a primeira dose vacinal com Leishmune<sup>®</sup> e o pico observado com a Leish-Tec<sup>®</sup> foi de 59,5%

no período de 21 dias após a primeira dose. Já foi descrito na literatura, o achado de soroconversão significativa, um pico relativo a máxima produção de anticorpos no período de 180 dias após o início do protocolo vacinal (MARCONDES, et.al., 2011). Neste estudo, o pico de soroconversão foi obtido no tempo de 6 meses de acompanhamento após o protocolo de imunização inicial (78,6%).

A utilização dos testes sorológicos para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral é um grande motivo para preocupação no Brasil, país endêmico para a doença que concentra mais de 90 % dos casos, devido à grande produção de anticorpos gerada pela vacinação, levando a não diferenciação entre animais vacinados e infectados (GALLEGO, et.al, 2017). Os resultados demonstrados neste estudo confirmam esse problema onde é demonstrada a reatividade cruzada entre os animais imunizados com a vacina Leish-Tec<sup>®</sup>, utilizada no Brasil atualmente com os testes preconizados pelo Ministério da Saúde (TR-DPP<sup>®</sup> e EIE<sup>®</sup>-LVC), ELISA *in house* e IFI. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam achados apresentados pela literatura, entretanto algumas diferenças observadas podem estar relacionadas a resposta imunológica individual do cão, estado nutricional e presença de outras infecções (REGINA-SILVA et.al., 2016), nesse projeto os animais foram acompanhados por um período de tempo superior aos trabalhos mencionados, como também há presença de uma dose de reforço vacinal no período de 1 ano após o protocolo de imunização inicial. É importante ressaltar que as amostras utilizadas neste projeto são provenientes de uma área hiperendêmica de uma região do Espírito Santo, diferentemente do trabalho desenvolvido por Campos et.al. (2017) em que os soros são provenientes de uma região não endêmica para a doença, Rio de Janeiro. Além disso, neste estudo foi utilizada um número maior de amostras se comparado a demais trabalhos (FERNANDES, et.al., 2008; MARCONDES et.al., 2013). Uma das limitações deste projeto é o fato de não ter sido possível a detecção do DNA de *Leishmania* sp. por meio da PCR, para confirmar se os animais que positivaram nos testes sorológicos estavam infectados ou não.

Estudos realizados para a avaliação da resposta humoral e celular de vacinas utilizadas na prevenção da LVC demonstram que 98% dos animais imunizados com a Leishmune<sup>®</sup> apresentaram soroconversão ao antígeno vacinal, FML, 60 dias após o término do protocolo vacinal e no período de sete meses após a primeira dose da vacina, 93% dos cães continuaram apresentando sorologia positiva (DA SILVA et.al. 2001; BORJA-CABRERA et. al., 2001). Testaticca demonstrou que 98% dos animais imunizados com Leish-Tec<sup>®</sup> apresentaram-se positivos em relação ao antígeno A2 1 mês após a imunização.

Em 6 meses após a vacinação a porcentagem diminuiu para 81,13%. Após a dose de reforço vacinal em 12 meses após a primeira dose o percentual voltou a ser 98%. Alguns relatos na literatura demonstram que os animais que são imunizados com a vacina Leishmune<sup>®</sup> apresentam maiores concentrações de anticorpos IgG em relação a aqueles vacinados com a Leish-Tec<sup>®</sup>, e que isso pode estar relacionado ao antígeno que compõem essas vacinas. O antígeno que compõe a vacina Leish-Tec<sup>®</sup>, o A2, pode induzir uma menor resposta humoral em relação ao antígeno da Leishmune<sup>®</sup>, o FML (FERNANDES, et.al, 2014). O FML é um complexo glicoproteico de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) donovani* (PALATNIK-DE-SOUZA et al., 1994) e o A2 é uma proteína recombinante de amastigota de *Leishmania (Leishmania.) donovani*, por isso, espera-se que como os testes são de antígeno de promastigotas uma resposta humoral maior na Leishmune<sup>®</sup>.

Os animais imunizados com a Leish-Tec<sup>®</sup> apresentam altos níveis de IFN- $\gamma$ , maior produção de anticorpos IgG2, específico ao antígeno A2, apresentando uma predominância da resposta imune Th1, cuja a principal função é a proteção do hospedeiro através da liberação de citocinas inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e a citocina reguladora IL-12, produzida pelas células dendríticas (ROMÃO, et.al., 2008). Como os testes sorológicos detectam a presença de IgG total presente no sangue do animal, não há uma diferenciação da resposta imune entre vacinados e infectados. Embora os testes sorológicos sejam compostos por antígenos promastigotas e o antígeno A2 que compõe a Leish-Tec<sup>®</sup> seja amastigota, não é esperado que ocorra reação cruzada (DE SOUZA TESTASICCA et al., 2014), entretanto, alguns estudos mostram que a reação cruzada pode ocorrer (MARCONDES, et.al., 2013; FERNANDES et.al., 2014).

O fato do animal apresentar uma resposta ao antígeno de promastigota e ter sido vacinado com o antígeno A2 (forma amastigota) pode ser reflexo do contato do animal com o parasito através do desafio natural, o que não impede de apresentar uma resposta com produção de anticorpos contra os antígenos presentes nos kits de imunodiagnóstico, como também uma resposta predominante Th1 contra as formas amastigotas, onde se encontra o antígeno contra o qual o animal foi vacinado. Além disso, a resposta imune contra os antígenos do imunodiagnóstico com 24 meses após a última dose da vacina Leish-Tec<sup>®</sup> pode refletir o quanto o mesmo foi exposto ao desafio natural e não desenvolveu a doença. Esse raciocínio reforça cada vez mais o entendimento sobre a retirada de um animal que apresenta-se positivo nos testes preconizados pelo Ministério da Saúde e não desenvolve sintomas. Para isso, é importante novos testes com outros antígenos de forma a ter um

diagnostico mais eficaz e não ter a necessidade de eutanasiar os animais resistentes a infecção, tal fenomeno é biologicamente possível.

Neste estudo, 78 animais estudados, apenas 22 conseguiram ser acompanhados durante todo o período, 24 meses após o esquema de imunização inicial. A dificuldade de acompanhamento dos animais estudados está relacionada principalmente ao local em que esses animais residem, região rural onde o controle de entrada e saída desses animais do domicílio é menor, com isso, muitas vezes o animal não é encontrado na visita de retorno ao domicílio para realização do acompanhamento do estudo. A falta de contato com o proprietário e de esclarecimentos por parte do mesmo em colaborar com o estudo também são fatores que colaboram para esse problema. Na análise desses 22 animais que receberam o acompanhamento em todos os meses avaliados, foi observado que o tempo que apresentou uma maior soropositividade foi o tempo de 24 meses para os testes TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC e IFI. O ELISA *in house* apresentou uma alta positividade nos tempos de 6 meses e 24 meses, o que reforça o texto acima.

Esses resultados demonstram a importância do período de acompanhamento maior após o início do protocolo vacinal. Mais recentemente, um estudo demonstrou que para o teste ELISA *in house* o pico referente a produção máxima de anticorpos pode demorar a ser observado, mas persiste até 180 dias e, portanto, a falta de monitoramento após a vacinação pode ser um dos fatores limitantes em estudos anteriores (MARCONDES et al., 2011). Dessa forma, neste estudo os animais imunizados com a Leish-Tec<sup>®</sup>, foram acompanhados por um período de 24 meses, período superior a maioria dos trabalhos desenvolvidos. Grimaldi e colaboradores demonstraram que animais imunizados com Leish-Tec<sup>®</sup> apresentam um período sem desenvolver infecção (tempo médio de soroconversão igual a 18 meses) superior em relação à animais sentinelas (tempo médio de soroconversão igual a de 9 meses). Essas evidencias indicam que os animais imunizados com Leish-Tec<sup>®</sup> desenvolveram mecanismos de resistência com mais eficiência para eliminar os parasitos em relação aos animais não imunizados, e a partir de 18 meses após o protocolo de imunização inicial, esses animais começam a apresentar uma diminuição da proteção vacinal e podem estar suscetíveis a novas infecções. Dessa forma, faz-se necessário salientar a necessidade de um tempo de acompanhamento maior, como apresentado no presente estudo em que os animais foram acompanhados por um período total de 24 meses, tempo superior em relação a outros trabalhos, sendo possível obter informações mais completas em relação a presença dos anticorpos no sangue dos animais estudados.

Este estudo avaliou o perfil de dispersão apresentado pelas amostras em cada tempo estudado, nos diferentes testes e grupos. Foi observado que o TR-DPP<sup>®</sup>, apresentou similaridade ao perfil dos animais não infectados (grupo III), apresentando significância estatística apenas nos tempos de 18 e 24 meses ( $p < 0,05$ , teste de Kruskal Wallis), tempos esses que apresentaram uma maior soroconversão. O EIE<sup>®</sup>-LVC foi o teste que apresentou maior homogeneidade entre os tempos e em relação as amostras do grupo III sem apresentar significância estatística ( $p > 0,05$ ). Já o ELISA *in house* foi o teste que apresentou o perfil de dispersão mais próximo ao obtido pelas amostras do grupo II (animais infectados), entretanto não apresentou significância estatística para esse grupo. Em relação ao grupo III apenas o primeiro tempo (1 mês) não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ). O alto valor observado para o desvio padrão na realização dos testes TR-DPP<sup>®</sup>, EIE-LVC<sup>®</sup>, ELISA *in house* e Imunofluorescência Indireta está diretamente relacionado a resposta imune do indivíduo vacinado em relação ao processo de imunização e desafio natural em campo (QUINNEL, et.al. 2013).

O Brasil atualmente preconiza a utilização de técnicas sorológicas no diagnóstico da LVC. De acordo com o Ministério da Saúde o TR-DPP<sup>®</sup> deve ser utilizado na triagem e o EIE<sup>®</sup>-LVC Bio-Manguinhos como confirmatório (BRASIL, 2011). Este protocolo passou a entrar em vigor no ano de 2011, antes disso, o EIE<sup>®</sup>-LVC Bio-Manguinhos era usado como triagem e a Imunofluorescência Indireta como confirmatório na avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos. A mudança ocorreu devido aos testes que utilizam antígeno recombinante no diagnóstico de LVC como o TR-DPP<sup>®</sup> que possuem uma maior especificidade (61 a 75%) e sensibilidade (72 a 77%) em relação a Imunofluorescência Indireta (FARIA; ANDRADE, 2012). A Imunofluorescência Indireta é um teste que pode apresentar limitações devido a reações cruzadas com outros tripanossomídeos uma vez que utiliza o antígeno bruto de *Leishmania* sp., necessita de equipamentos de alto custo devido à alta tecnologia empregada, como o microscópio de Imunofluorescência, dessa forma, necessita de profissionais capacitados (COURA-VITAL et.al., 2014).

Este estudo evidencia que com o protocolo antigo é possível identificar um maior número de animais positivos, foram identificados 21 animais positivos utilizando o EIE<sup>®</sup>-LVC como triagem e a IFI como confirmatório em relação ao protocolo atual, o qual foi identificado 15 animais. É observado que grande parte dos animais que soroconverteram no cenário atual são os mesmos que soroconverteram no cenário antigo. No tempo de 1 mês, o animal classificado como positivo segundo o cenário atual foi o mesmo animal considerado

positivo segundo o cenário antigo. No tempo de 6 meses, o animal considerado positivo no cenário atual também foi considerado positivo segundo o cenário antigo. No tempo de 18 meses, dos 5 animais considerados positivos no cenário atual, 4 deles também foram considerados positivos no cenário antigo. No tempo de 24 meses dos 8 animais considerados positivos no cenário atual, 6 também são considerados positivos no cenário antigo.

Considerando apenas os animais que foram acompanhados em todos os tempos estudados (22 animais), no cenário atual, 8 animais soroconverteram, já no cenário antigo, 6 animais soroconverteram. Foi observado que para os animais que foram acompanhados em todos os tempos, o cenário atual conseguiu identificar um número maior de animais positivos em relação ao cenário antigo. Diferentemente dos animais que não foram acompanhados em todos os tempos, neste caso, o cenário antigo identificou maior quantidade de animais positivos.

Contudo, de acordo com os resultados apresentados, o protocolo antigo preconizado pelo Ministério da Saúde identificou um maior número de animais positivos em relação ao protocolo atual. Entretanto, apenas com os dados sorológicos não é possível afirmar que esses animais sejam realmente positivos, análises confirmatórias complementares serão necessárias como os exames de carga parasitária (PCR ou cultura). A realização da carga parasitária não foi possível neste trabalho, pois só tivemos a possibilidade de trabalhar com amostras clínicas de soro, não com o animal vivo. Mais trabalhos devem ser realizados a fim de avaliar a carga parasitária desses animais, neste apenas foi avaliado a resposta sorológica.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os anticorpos protetores gerados em animais imunizados levam a um resultado positivo frente aos testes preconizados pelo Ministério da Saúde no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina, podendo gerar um confundimento quanto ao papel epidemiológico deste cão frente a campanha de controle da doença. Por outro lado, o antígeno vacinal da Leish-Tec<sup>®</sup>, A2 uma subunidade de amastigota, é oriundo de um estágio evolutivo do parasito diferente daquele que infecta o hospedeiro vertebrado, com isso, não é esperado que ocorra a soroconversão, uma vez que é gerada uma resposta diversa após a vacinação. É compreensivo que mesmo os animais vacinados soroconvertam para os antígenos utilizados nos testes de imunodiagnóstico, pois esses animais após a vacinação são desafiados naturalmente pelo parasito na área endêmica. A resposta imune gerada pela vacinação é indistinta daquela induzida pela infecção natural, utilizando os testes de imunodiagnóstico disponíveis para LVC. Embora a vacinação seja uma opção que oferece segurança, é muito importante distinguir animais infectados, de um

animal vacinado soro reativo, através de acompanhamento clínico e diagnósticos parasitológicos. Assim, é necessário que outros estudos continuem sendo realizados de forma a avaliar como os cães se comportam frente a vacinação, além da descoberta de outras formas de diagnóstico. Atualmente, o diagnóstico vem sendo cada vez mais aprimorado, de forma que novas técnicas estão sendo desenvolvidas para obter a diferenciação da infecção natural da vacinação, dentre elas pode-se citar a citometria de fluxo, baseada na diferenciação entre os títulos de IgG1 e de IgG2 (CAMARGO et.al., 2007).

## 8 CONCLUSÕES

- A percentagem de soroconversão detectada utilizando o TR-DPP<sup>®</sup> foi de 18,7%, o EIE<sup>®</sup>-LVC foi de 14,21%, o ELISA *in house* foi de 40,60% e a IFI foi de 15,2%. Em todos os tempos de análises o percentual de animais que não converteram foi maior que os animais vacinados que não soroconverteram foi maior (mais de 80%) que o número de animais vacinados que soroconverteram.
- O ELISA *in house* foi o teste que apresentou uma maior soroconversão considerando o tempo total de acompanhamento (24 meses) em relação aos demais testes, em seguida foi o TR-DPP<sup>®</sup>, IFI e por último o EIE<sup>®</sup>-LVC.
- Foi demonstrado neste estudo uma soropositividade nos testes TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC, IFI e ELISA *in house* em todos os tempos de acompanhamento. Entretanto, os tempos de 18 e 24 meses foram os que mais soropositividade foi detectada utilizando os testes TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC, IFI. Utilizando teste de ELISA *in house* o tempo de 6 meses foi o que mais detectou soropositividade.
- Foi demonstrado que o perfil de soroconversão obtido para as amostras do grupo dos vacinados com a Leish-Tec é mais próximo das amostras do grupo dos animais não infectados utilizando o TR-DPP<sup>®</sup>, EIE<sup>®</sup>-LVC e IFI, com exceção do ELISA *in house* em que o perfil de soroconversão das amostras foi mais distante.
- Em relação ao protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde atualmente (TR-DPP<sup>®</sup> como triagem e EIE<sup>®</sup>-LVC como confirmatório) para o diagnóstico da LVC, foi possível detectar 15 animais vacinados que soroconverteram.
- Embora não tenha sido significativa a diferença ( $P > 0,05$ , Teste Qui-Quadrado), utilizando o protocolo antigo preconizado pelo Ministério da Saúde (EIE<sup>®</sup>-LVC como triagem e IFI como confirmatório) para o diagnóstico da LVC, foi possível detectar 21 animais vacinados que soroconverteram.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P. et al. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 13, n. 5, p. 537–550, 1991a.

ABRANCHES, P. et al. Canine Leishmaniasis: Pathological and Ecological Factors Influencing Transmission of Infection. **The Journal of Parasitology**, v. 77, n. 4, p. 557, 1991b.

AEBISCHER, T., Recurrent cutaneous leishmaniasis: A role for persistent parasites?, **Parasitology Today**, v. 10, n. 1, p. 25–28, 1994.

ALENCAR, J. E. Calazar canino, contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Fortaleza-Ceará. **Ceará: Universidade Federal do Ceará**, 1959.

ALMEIDA, M. A. O. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 3–4, p. 227–232, 2005.

ALMEIDA, M.C. et. al. Leishmanial infection: Analysis of first steps. A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 98 n.7 p.861-870, 2003.

ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1–88, 2004.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ARAÚJO, C.; COSTA, A.; RISSO, J. Uso da Miltefosina como terapia combinada em Leishmaniose visceral canina – Relato de caso, **Enciclopédia Biosfera**, v. 15, n. 27, p. 106–116, 2018.

ASHFORD, D.A. et.al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n.1, p.53-57, 1998.

AZEVEDO, P. et al. The effect of fragmentation on phlebotomine communities (Diptera: Psychodidae) in areas of ombrophilous forest in São Luís, state of Maranhão, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 2, p. 271–277, 2011.

BARRETTO, A.V.P. Anclivepa-MG realizou debate sobre a leishmaniose. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 11, n.64, p.28-30, 2006.

BARROUIN-MELO, S. M. et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, n. 2, p. 331–339, 2006.

BERRAHAL, F. et al. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 3, p. 273–277, 1996.

BIO-MANGUINHOS- FIOCRUZ. **Manual DPP-Leishmaniose Visceral Canina**, 2018.

BIO-MANGUINHOS- FIOCRUZ. **Manual EIE-Leishmaniose Visceral Canina**, 2018.

Disponível em:

[https://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/manuais/leishmaniose/BM\\_014\\_08Bk\\_EIEI\\_eish\\_can.pdf](https://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/manuais/leishmaniose/BM_014_08Bk_EIEI_eish_can.pdf). Acesso em: 31 jul. 2018

BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniasis: General Aspects Related with the Disease, the Parasite Cycle, Available Drugs, Novel Prototypes and Vaccines. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 861–876, 2017.

BLAVIER, A. et al. Atypical Forms of Canine Leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v. 162, n. 2, p. 108–120, 2001.

BOARINO, A., BOLLO, E., PRUNOTTO, L., CANALE, L., USLENGHI, F., POLETTI, P. Application of recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. v.31, n.6, p.527-536, 2008.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitology Today (Personal Ed.)**, v. 15, n. 1, p. 22–28, 1999.

BORJA-CABRERA, G.P. et.al. Long lasting protection agaisnt canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v. 20, p. 3277-328, 2001.

BOURDOISEAU, G. et al. Effective humoral and cellular immunoprotective responses in LiESAp-MDP vaccinated protected dogs. **Veterinary immunology and immunopathology, Amsterdam**, v. 128, n. 1-3, p. 71-78, 2009.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância em Saúde**, volume único, 2ª edição, 2017.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose Visceral, 2017. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/leishvisceral-17-novo-layout.pdf>. Acesso em: 22 jan.2020.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1ª ed. 5ª impressão. DF, 2014a.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. **Mudança de fornecedor e teste rápido imunocromatográfico ofertado para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana no Sistema Único de Saúde (SUS)**. CGLAB/DAEVS/SVS/MS, 2019

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **ANVISA-MAPA 1.426 de 11/07/2008**, Brasília, DF. 2008a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Nota técnica N° 038/2014/DFIP/SDA**, Brasília, DF. 2014b

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Nota Técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA**, Brasília, DF.2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Portaria IM nº 1.426**, Brasília, DF. 2008b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças transmissíveis. **Nota informativa nº 3/2018-CGLAB/DEVIT/SVS/MS**, Brasília, DF.2018

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças transmissíveis. **Nota Técnica conjunta nº 1/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS**, 2011.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL B. G.; *Biologia de flebotomíneos do Brasil*, In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. cap. 4, p.257-274.

BUFFET, P. **Leishmaniose: Informações sobre o Tratamento**. Paris: Sanofi, 2008.

BURNS-JR, J. M. et.al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and american visceral leishmaniasis. **Parasitology Today**, v. 9, n. 7, p. 240, 1993.

CAMARGO, J.B.; TRONCARELLI, M.Z.; RIBEIRO, M.G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 12, n.71, p.86-92, 2007.

CAMARGO, M. E.; REBONATO, C. Cross-Reactivity in Fluorescence Tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* Antibodies: A Simple Inhibition Procedure to Ensure Specific Results\*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 4, p. 500–505, 1 jul. 1969.

CAMPOS, M. P. DE *et al.* Can vaccines against canine visceral leishmaniasis interfere with the serological diagnostics recommended by the Brazilian Ministry of Health? **Ciência Rural**, v. 47, n. 4, 2017.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n.11, p.873–882, 2007.

COLER, R.; REED, S. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 5, p. 244–249, 2005.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Serviço Público Federal. **Perguntas e Respostas sobre a Leishmaniose Visceral Canina (LVC), questões técnicas e legais**.

Disponível em:

[http://portal.cfmv.gov.br/uploads/files/07\\_11\\_2017\\_Perguntas%20e%20Respostas%20LVC\\_%20Atualiza%C3%A7%C3%A3o%201\(1\).pdf](http://portal.cfmv.gov.br/uploads/files/07_11_2017_Perguntas%20e%20Respostas%20LVC_%20Atualiza%C3%A7%C3%A3o%201(1).pdf). Acesso em 16 abril, 2020.

COSTA R.T. et.al. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 97, n.6, p.678-82, 2003.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? a critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 232–242, 2011.

COURA, J. R., **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**, 2ª Edição, v.2, n.2 p. 761-775, 2013.

COURA-VITAL, W. et al. Evaluation of Change in Canine Diagnosis Protocol Adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a New Proposal for Diagnosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91009, 2014.

COURTENAY, O. et al. Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314–1320, 2002.

COUTINHO, S. G. et al. A surgery for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 1, p. 17–22, 1985.

DA SILVA, V.O. et.al. A phase III trial of efficacy of the FML vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v. 19, p.1082-1092, 2001.

DANTAS-TORRES, F; BRITO, MEF; BRANDÃO-FILHO, SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.54– 60, 2006.

DE QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with IFAT and ELISA-test. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Órgão Oficial Do Colégio Brasileiro De Parasitologia Veterinaria**, v. 19, n. 1, p. 32–38, 2010.

DE SOUZA TESTASICCA, M. C. et al. Antibody responses induced by Leish-Tec®, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3–4, p. 169–176, ago. 2014.

DEANE L.M., DEANE M.P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, ceará. **O Hospital**. v. 47 p.75-87, 1955.

DEPLAZES, P. et.al. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunology**. v.17, p. 451-458, 1995.

DESJEUX, P., Leishmaniasis: current situation and new perspectives, **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

- DYE, Christopher, The Logic of Visceral Leishmaniasis Control, **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 2, p. 125–130, 1996.
- EVANS, T.G. et.al. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. **The American Journal of Tropical. Medicine and Hygiene**. v. 42. n. 2, p. 118 -123, 1990.
- FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. DE. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47–57, 2012.
- FERNANDES AP et.al. Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**. v. 26, n.46, p.5888-95. 2008.
- FERNANDES, A. P. et al. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 476–485, ago. 2012.
- FERNANDES, C. B. *et al*, Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis, **Vaccine**, v. 32, n. 11, p. 1287–1295, 2014.
- FERREIRA, E.C. et.al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**. v. 146, p. 235-241, 2007.
- FISA, R. et al. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 105–111, 2001.
- FOGANHOLI, J. N.; ZAPPA, V. **Importância da Leishmaniose na Saúde Pública**. p. 45, 2011.
- FRASER, C. M. Manual Merck de Veterinária: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para veterinária. 9ª ed. **São Paulo: Roca**, p. 543-544, 2008
- FREITAS J.C.C., PINHEIRO D.C.S.N. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania spp*. Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania spp*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, p. 11-20, 2010
- GHOSH, A.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, v. 20, n. 1–2, p. 59–66, 2001.
- GHOSH, M. et al. *Leishmania donovani* infection of human myeloid dendritic cells leads to a Th1 response in CD4+ T cells from healthy donors and patients with kala-azar. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 3, p. 294–301, 2006.
- GIUNCHETTI, R. C. et al. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. **Vaccine**, v. 25, n. 44, p. 7674–7686, 2007.

- GOMES, Y. M. et al. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **Veterinary Journal (London, England: 1997)**, v. 175, n. 1, p. 45–52, 2008.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.
- GRADONI, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine Leishmania vaccine. **Veterinary Parasitology**, v. 100, n. 1–2, p. 87–103, 2001.
- GRIMALDI, G. *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, **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54–59, 2012.
- GRIMALDI, G. et al. Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. **Plos One**, v. 12, n. 9, p. e0185438, 2017.
- GUARGA, J.L. et.al. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity among naturally infected dogs to sandflies is associated with lower proportions of T helper cells. **Research in Veterinary Science**. v. 69, p.249-253, 2000.
- GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 2, n. 8, p. 494–501, 2002.
- HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 229–243, 2001.
- HARHAY, Michael O. *et al*, Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil, **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403–409, 2011.
- HOMMEL, M. et al. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 72, n. 3, p. 213–218, 1978.
- INIESTA, L., GÁLLEGO, M., PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Veterinary Immunology Immunopathology**. v. 103, p. 77-81, 2005.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.
- LAMOTHE, J., GAUDRAY, CH., ZARKA, P. Diagnostic de la leishmaniose canine. **Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**. v. 39, p. 41-46, 2004.
- LEMESRE, J.-L. et al. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. **Vaccine**, v. 23, n. 22, p. 2825–2840, 2005.

- LEMOS E.M. et.al. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid test (Kalazar Detec TM) in dogs with and without signs of disease. **Acta Tropica**. v.107, p. 205-207, 2008.
- LEWIS, D. J. The Biology of Phlebotomidae in Relation to Leishmaniasis. **Annual Review of Entomology**, v. 19, n. 1, p. 363–384, 1974.
- LIMA, W. G. et al. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, v. 92, n. 1, p. 43–53, 2004.
- MACEDO I.T.F., et.al. Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de Leishmaniose Visceral no Município de Sobral, Ceará, Brasil. **Ciência Animal**, v. 18, n.2, p.67-74, 2008.
- MAIA C., CAMPINO L. Methods for diagnosis of canine Leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**. v.158, n.4, p.274-87, 2008
- MALTEZOU, H. C. Visceral leishmaniasis: advances in treatment. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 3, n. 3, p. 192–198, 2008.
- MANNA, L. et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3–4, p. 251–262, 2004.
- MARCONDES, M. et al. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune. **Veterinary Parasitology**, v.197, p.649-652, 2013.
- MARCONDES, M. et. al. Temporal IgG subclasses response in dogs following vaccination against Leishmania with Leishmune®, **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2–4, p. 153–159, 2011.
- MAYRINK, W. et al. Phase I and II open clinical trials of a vaccine against Leishmania chagasi Infections in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 6, p. 695-697, 1996.
- MIRÓ, G., CARDOSO, L., PENNISI, M.G., OLIVA, G., BANETH, G. Canine leishmaniosis – New concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends of Parasitology**. v. 24, n. 8, p. 371-377, 2008.
- MOLINA R et. al. Infectivity of dogs naturally infected with Leishmania infantum to colonized Phlebotomus perniciosus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**; v. 88, p.491- 493, 1994.
- MONTEIRO E. et.al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais, 2005.
- NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1464–1488, 2011.

OLLIARO, P. L. et al. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 763–774, 2005.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. et al. Experimental murine *Leishmania donovani* infection: immunoprotection by the fucose-mannose ligand (FML). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 27, n. 2, p. 547–551, 1994.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. et al. FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 7, n. 6, p. 833–851, 2008.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. et al, Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune® in Brazilian endemic areas, **Vaccine**, v. 27, n. 27, p. 3505–3512, 2009.

PELLISSARI, D. M. et al. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107–110, 2011.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229–235, 1994.

PRAJEETH, C. K. et al. *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 7, p. 2699–2708, 2011.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, p. 141–146, 2004.

QUINNELL, R. J. Evaluation of rK39 rapid diagnostic for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v.7, n.1, p. e1992, 2013.

REGINA-SILVA et.al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**. v. 34, p. 2233–2239, 2016.

REIS, A. B. et al. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 7, p. 341–349, 2010.

REITHINGER R, QUINNELL RJ, ALEXANDER B, DAVIES CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal Clinical Microbiology**. v. 40, n.7, p.2352-6, 2002.

REY L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2011.

RIBEIRO, F. C. et al. Use of ELISA employing Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) chagasi antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs, **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3–4, p. 200–206, 2007.

RIBEIRO, F.C. et.al. Use of ELISA employing homologous and heterologous antigens for the detection of IgG and subclasses (IgG1 and IgG2) in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v.53, n.5, p. 283-9, 2011.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. et.al. A long experimental study of canine visceral leishmaniasis. **International Journal of Parasitology**. 2007. (In press).

ROMÃO, P. R. T. et.al. Leishmaniasis: immune response and antioxidants mechanisms of evasion. 2008.

SEAMAN, J.; MERCER, A. J.; SONDRUP, E. The epidemic of visceral leishmaniasis in western Upper Nile, southern Sudan: course and impact from 1984 to 1994. **International Journal of Epidemiology**, v. 25, n. 4, p. 862–871, 1996.

SHERLOCK, I. A. Importância Médico-Veterinária. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro**. Editora Fiocruz, cap. 1, p. 15- 22, 2003.

SILVA D.A. et.al. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Journal**. v.195, p.252-3, 2013.

SILVA, E. A. E; ANDREOTTI, R.; HONER, M. R. Comportamento de Lutzomyia longipalpis, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 420–425, 2007.

SILVA, K. L. O. et al. **Vaccines Vs Leishmaniasis: A Review**. p. 11, 2013.

SOLANO-GALLEGO, L. et al, Diagnostic Challenges in the Era of Canine Leishmania infantum Vaccines, **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 9, p. 706–717, 2017.

SUNDAR S, RAI M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 9, p. 951-8. 2002

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 3, p. 287–292, 1995.

TILLEY, L. P., SMITH Jr, F. W. K. Consulta Veterinária em 5 minutos – espécie canina e felina. Editora Manole. 3ª ed. 2008. Acesso em 31 de jul

VITORIANO-SOUZA, J. et al. Kinetics of cell migration to the dermis and hypodermis in dogs vaccinated with antigenic compounds of Leishmania braziliensis plus saponin. **Vaccine**, v. 26, n. 31, p. 3922–3931, 2008.

VOLLER A.; BIDWELL D.E., BARTLETT A.N.N. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. **Bull World Health Organ**. v.53, p. 55-65, 1976.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 5, p. 851–856, 2014.

WERNECK, G. L., Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010). **Control of the Leishmaniasis**. WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2015). **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015**. World Health Organization. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/152781>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2018). ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico**, 2018.

Disponível em:

[http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6\\_por.pdf?sequence=5](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5). Acesso em: 31 jul. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2020). **Leishmaniasis 2020**. Disponível em: [https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/). Acesso em: 22 jan. 2020.

ZUBEN, A. P. B. V.; DONALÍSIO, M. R., Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros, **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, 2016.