

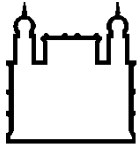
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**APLICABILIDADE DE TESTES RÁPIDOS PARA VIGILÂNCIA E  
CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREAS  
ENDÊMICAS.**

**ERIKA MOUTINHO COSTA**

Rio de Janeiro  
2019



Ministério da Saúde

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

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*ERIKA MOUTINHO COSTA*

Aplicabilidade de testes rápidos para vigilância e controle da Leishmaniose Visceral Canina em áreas endêmicas.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

**Orientador:** Prof. Dr. Renato Porrozzi de Almeida

**RIO DE JANEIRO**

2019

Costa, Erika Moutinho .

Aplicabilidade de testes rápidos para vigilância e controle da Leishmaniose Visceral Canina em áreas endêmicas. / Erika Moutinho Costa. - Rio de Janeiro, 2019.

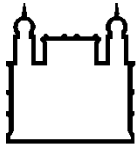
185 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientador: Renato Porrozzi de Almeida.

Bibliografia: f. 147-176

1. Leishmaniose Visceral Canina. 2. Diagnóstico Molecular. 3. Diagnóstico Sorológico. 4. Cães Assintomáticos. 5. Testes Rápidos. I. Título.



Ministério da Saúde

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

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***AUTOR: ERIKA MOUTINHO COSTA***

**APLICABILIDADE DE TESTES RÁPIDOS PARA VIGILÂNCIA E CONTROLE DA  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREAS ENDÊMICAS.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Renato Porrozzi de Almeida**

**Aprovada em: 23/09/2019**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Otacílio da Cruz Moreira (IOC – FIOCRUZ) - Presidente**

**Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero (UnB)**

**Prof. Dr. Rodrigo Caldas Menezes (INI – FIOCRUZ)**

**Prof. Dr. Adriano Gomes da Silva (INI – FIOCRUZ)**

**Prof. Dra. Kátia da Silva Kalabrese (IOC – FIOCRUZ)**

Rio de Janeiro, 23 de setembro de 2019

*Para minha mãe que sempre me apoiou e incentivou durante essa longa caminhada.*

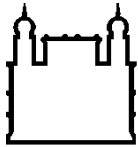
## AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Renato Porrozzi, meu orientador, pela oportunidade, apoio e incentivo.
- Ao Dr. Bruno Travi, meu co-orientador, pelas contribuições e experiência na UTMB.
- À Dra. Fernanda Morgado, que sempre esteve me ajudando desde a entrada no laboratório.
- À Dra. Elisa Cupollilo, pelas contribuições e conhecimento compartilhado.
- À Dra Luiza Pereira pelo auxílio principalmente com os resultados PCR em Tempo Real.
- À Dra. Bárbara Neves pelo suporte durante todo o desenvolvimento do projeto.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz.
- Às Plataformas de PCR em tempo Real– PDTIS/FIOCRUZ para uso de suas instalações.
- Ao Dr. Otacílio Moreira e Maria Angelica Cardoso, pelo auxílio durante os experimentos.
- Ao Dr. Fernando Genta e Dra. Samara Latgé, do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Insetos, pela doação dos flebotomíneos e preparo dos recipientes para realização do teste.
- Ao Dr. Reginaldo Brazil, pelas orientações sobre o xenodiagnóstico.
- Msc. Aurea Virgínia pelo companheirismo e suporte nas viagens de campo.
- Ao Dr. Cristian Souza suporte nas viagens de campo.
- Ao Centro de Controle de Zoonoses de Governador Valadares pelo apoio durante todo o projeto, a equipe do laboratório Michael, Brenda, Willa, aos agentes de saúde Ricardo e José Henrique, as veterinárias Aimara Costa, Gleisiane Leal, Luana Marques e Kerollene Alves.
- A população e os cães de Governador Valadares, que foi tão receptiva ao nosso estudo.
- Ao Dr. Adriano Gomes da Silva pela revisão da tese.
- À banca examinadora
- Aos membros do Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose e Coleção de Leishmaniose do IOC, Dra. Mariana Boité, Dra. Patrícia Cuervo, Dra. Rosane Temporal, MSc. Luis Eduardo Paes, MSc. Hellen Ramos, Carlos Henrique da Silva e Selma Soares
- Aos companheiros de laboratório, Bruna das Chagas, Francini Ribeiro, Gabriela da Silva, Jonathan da Silva, Lilian Cantanhêde, Marne Chagas, Nathalia de Souza, Renata do Nascimento e Tainã Luís de Souza, em especial Camila Filgueira, Caroline Batista, Leonardo Ruivo.
- À minha mãe Nilia Moutinho e minha madrinha Nilza Moutinho, pela compreensão e incentivo.
- Ao Luis Guilherme Teixeira, pelo incentivo e apoio.
- Ao Rony, por tornar mais leve esse processo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, NIH e FIOCRUZ .

“DAS UTOPIAS  
Se as coisas são inatingíveis... ora!  
Não é motivo para não querê-las...  
Que tristes os caminhos, se não fora  
A presença distante das estrelas!”

*Mario Quintana*



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **APLICABILIDADE DE TESTES RÁPIDOS PARA VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREAS ENDÊMICAS.**

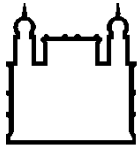
#### **RESUMO**

#### **TESE DE DOUTORADO**

**Erika Moutinho Costa**

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença vetorial, zoonótica, sistêmica progressiva causada por protozoários da espécie *Leishmania infantum* nas Américas, e transmitida por flebotomíneos, principalmente a *Lutzomyia longipalpis*. Os cães são considerados os principais reservatórios urbanos da doença, sendo, portanto, um dos principais alvos no programa de controle da LVC no Brasil. O diagnóstico da LVC é complexo, pois a doença apresenta uma sintomatologia variada, além de um grande número de animais assintomáticos. Este estudo teve como objetivo avaliar a aplicabilidade de métodos moleculares e sorológicos na detecção da infecção por *L. infantum* em cães com baixo escore clínico, assim como investigar o potencial desses animais como fonte de infecção para os flebotomíneos. Este estudo é composto por duas etapas, onde 146 cães assintomáticos de uma área endêmica do Brasil foram avaliados de forma a comparar métodos diagnósticos disponíveis para LVC. Somado a esses cães, 111 cães de diversos escores clínicos foram analisados visando a aplicação da metodologia de interpretação semiquantitativa do DPP®LVC (teste sorológico) como forma de estadiamento e manejo dos cães infectados. Foi também avaliado a RPA-LF (teste molecular) como teste rápido complementar ao DPP®LVC. Em áreas endêmicas existe uma parcela de animais infectados que não são identificados pelo teste sorológico rápido DPP®LVC, sendo necessário associação com outros testes. No caso deste estudo, a RPA-LF demonstrou ser um bom candidato a teste molecular rápido para ser associado ao DPP®LVC, pois é capaz de detectar animais recém infectados, que ainda não apresentam soroconversão detectável. O uso de um índice de reatividade (IR) baseado na relação da banda teste com a controle permitiu a normalização dos resultados, apresentando correlação positiva com a carga parasitária esplênica. Os animais com IR alto tenderam a uma evolução clínica desfavorável. A infectividade para o vetor esteve presente em cães com baixo escore clínico com resultados laboratoriais variáveis. O teste RPA-LF foi o que mais identificou animais capazes de infectar o vetor, sendo importante a sua realização principalmente em animais com  $IR > 0,2$ , visando identificar precocemente focos de infecção para o vetor. Dessa forma, o IR se mostrou uma ferramenta simples e de baixo custo que, associado ao RPA-LF permite a identificação e o manejo de cães em áreas endêmicas. Representando recursos que poderiam ser aplicados no controle da Leishmaniose Visceral.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### APPLICABILITY OF RAPID TESTS FOR SURVEILLANCE AND CONTROL OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN ENDEMIC AREAS.

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

**Erika Moutinho Costa**

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a progressive, zoonotic, systemic, vector disease caused by protozoa of the species *Leishmania infantum* in the Americas, and transmitted by sandflies, as *Lutzomyia longipalpis*. Dogs are considered the main urban reservoirs of the disease, and they are one of the main targets in the CVL control program in Brazil. The diagnosis of CVL is complex, as the disease has a variety of symptoms, in addition to a large number of asymptomatic dogs. This study aimed to evaluate the applicability of molecular and serological methods in the detection of *L. infantum* infection in dogs with low clinical score and to investigate the potential of these animals as a source of infection for sandflies. This study had two stages, where 146 asymptomatic dogs from an endemic area of Brazil were evaluated to compare diagnostic methods available for CVL. In addition to these dogs, 111 dogs of different clinical scores were analyzed to apply the semi-quantitative interpretation of the DPP®CVL result (serological test) as a way of staging and handling infected dogs. RPA-LF (molecular test) was also evaluated as a complementary rapid test to DPP®LVC. In endemic areas there is a group of infected animals that are not identified by the rapid serological test (DPP®CVL), requiring association with other tests. In the case of this study, RPA-LF proved to be a good candidate for rapid molecular testing to be associated with DPP®LVC, as it can detect recently infected animals, which do not yet have detectable seroconversion. The use of a reactivity index (IR) based on the relationship of the test band with the control band allowed the normalization of the results and IR showed a positive correlation with the splenic parasitic load. The animals with high IR tended to have an unfavorable clinical evolution. Infectivity to the vector was present in dogs with a low clinical score with variable laboratory results. The RPA-LF test was the one that most identified animals capable of infecting the vector, and it is important to perform it mainly on animals with  $RI > 0.2$ , aiming to identify sources of infection for the vector precociously. Thus, the IR proved to be a simple and low-cost tool that, associated with the RPA-LF, allows the identification and management of dogs in endemic areas. Representing resources that could be applied in the control of Visceral Leishmaniasis.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Sistema de classificação taxonômica de espécies de <i>Leishmania</i> , considerando a descrição original das espécies e classificações propostas com base em critérios extrínsecos e a partir dos resultados obtidos por métodos bioquímicos e moleculares. (Adaptado de Cupolillo et al., 2014).....	24
<b>Figura 1.2.</b> Panorama da endemicidade da Leishmaniose Tegumentar no Mundo em 2016. (Adaptado de WHO, 2018) .....	26
<b>Figura 1.3.</b> Panorama da endemicidade da Leishmaniose Visceral no Mundo em 2016. (Adaptado de WHO, 2018) .....	26
<b>Figura 1.4.</b> Casos e coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, Brasil, 2008 a 2017 (Brasil, 2017).....	27
<b>Figura 1.5.</b> Taxa de letalidade por Leishmaniose Visceral, Brasil, 2008 a 2017 (Ministério da Saúde, 2017).....	28
<b>Figura 1.6.</b> Casos de Leishmaniose Visceral por regiões brasileiras, 2008 a 2017 (Ministério da Saúde, 2017) .....	28
<b>Figura 1.7.</b> Casos de Leishmaniose Visceral por regiões brasileiras, 2008 a 2017 (Ministério da Saúde, 2017) .....	29
<b>Figura 1.8.</b> Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> no flebotomíneo. (a) Ciclo de desenvolvimento clássico de parasitas de <i>Leishmania</i> . (b) As refeições de sangue subsequentes promovem o estabelecimento do parasito, desencadeando a desdiferenciação das promastigotas metacíclicas em retroleptomonadas multiplicativas, amplificando seus números e aprimorando a transmissão. (Adaptado de Serafim <i>et al.</i> , 2018.).....	34
<b>Figura 1.9.</b> Ciclo biológico na Leishmaniose. (Adaptado de Harhay et al., 2011). .....	35
<b>Figura 1.10.</b> Manifestações clínicas comumente encontradas em cães com Leishmaniose Visceral. (a) Caquexia, (b) Dermatite exfoliativa, (c) Úlceras cutâneas, (d) Lesões cutâneas no focinho, (e) Uveíte e (f) Epistaxe. Imagens arquivo Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose (LPL). .....	38
<b>Figura 1.11.</b> Marcadores de resistência e suscetibilidade na Leishmaniose Visceral Canina. A suscetibilidade e resistência ao desenvolvimento da Leishmaniose Visceral Canina dependem da resposta imune desencadeada no cão após infecção natural. (Adaptado de Reis et al., 2010). .....	41

<b>Figura 1.12.</b> Visão geral da interação complexa entre as respostas Th1 e Th2 na Leishmaniose Visceral Canina. As respostas mistas Th1 e Th2 ocorrem em cães infectados, e assume-se que o equilíbrio entre essas respostas se inclina na direção Th2 em cães que evoluem para a doença clínica, enquanto uma atividade Th1 de proteção mais forte direciona a resistência. As citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ estão relacionadas com ativação de macrófagos e a morte de parasitas por NO (resposta Th1). Por outro lado, IL-10, TGF- $\beta$ e IL-4 estão envolvidos na disseminação do parasita associada à atividade aumentada de células B (B) e plasmócitos (P) e hiperglobulinemia (resposta Th2). As respostas Th1 são reguladas negativamente pela IL-10 produzida pelas células T reguladoras (Treg). A IL-10 também é produzida por células da linhagem Th1, como moduladora da imunopatologia secundária desencadeada pela infecção, mas também previne a imunidade estéril e permite a persistência de infecção de baixo nível. (Adaptado de Baneth et al., 2008).	42
<b>Figura 1.13.</b> Representação esquemática da distribuição da Leishmaniose Visceral entre a população canina em um foco endêmico. (Adaptado de Baneth et al., 2008.)	46
<b>Figura 3.1.</b> Desenho experimental para o objetivo: Avaliar a capacidade da RPA-LF identificar cães com baixo escore clínico infectados por <i>L. infantum</i> em condições de campo. qPCR: Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa; RPA-LF: <i>Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow</i> ; DPP®LVC: <i>Dual Path Platform</i> para diagnóstico Leishmaniose Visceral Canina; ssrRNA: Subunidade 18S do RNA ribossomal de <i>Leishmania</i> sp.; kDNA: Ácido deoxirribonucléico dos minicírculos do cinetoplasto de <i>Leishmania</i> sp.	62
<b>Figura 3.2.</b> Desenho experimental para os objetivos: avaliar os resultados do teste DPP®-LVC de forma semiquantitativa através do cálculo do índice de reatividade em cães com diversos escores clínicos; relacionar os valores de índice de reatividade com a carga parasitária esplênica e do linfonodo; avaliar o RPA-LF como método de diagnóstico alternativo para postos de atendimento; elaborar recomendações para o manejo dos cães de áreas endêmicas para Leishmaniose Visceral Canina baseadas no conceito de índice de reatividade, positividade nos testes moleculares e capacidade de infectar o vetor. DPP®LVC: <i>Dual Path Platform</i> para diagnóstico Leishmaniose Visceral Canina; IR: Índice de Reatividade; qPCR: Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa; RPA-LF: <i>Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow</i> ; ssrRNA: Subunidade 18S do RNA ribossomal de <i>Leishmania</i> sp.; HPRT: Hipoxantina fosforibosiltransferase	63

**Figura 3.3.** Desenho experimental para os objetivos: avaliar a capacidade de infectar o vetor em cães com baixo escore clínico por meio de xenodiagnóstico; realizar o acompanhamento de cães a fim de avaliar a variação do índice de reatividade, progressão da carga parasitária e o tempo necessário para cães positivos para *L. infantum* serem capazes de infectar o vetor; elaborar recomendações para o manejo dos cães de áreas endêmicas para Leishmaniose Visceral Canina baseadas no conceito de índice de reatividade, positividade nos testes moleculares e capacidade de infectar o vetor. Grupo A: cães positivos para todos os testes na análise de janeiro de 2018; Grupo B: cães positivos apenas no DPP®LVC na análise de janeiro de 2018; Grupo C: cães que apresentam RPA-LF positivo na análise de janeiro de 2018; Grupo D: cães negativos para todos os testes na análise de janeiro de 2018; DPP®LVC: *Dual Path Platform* para diagnóstico Leishmaniose Visceral Canina; IR: Índice de Reatividade; LVC: Leishmaniose Visceral Canina; qPCR: Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa; RPA-LF: *Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow*..... 64

**Figura 3.4.** Localização do município de Governador Valadares no Brasil e no estado de Minas Gerais (esquerda). Localização dos bairros de Vila Isa e Santa Helena (direita). Disponível em <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1107863> (esquerda). Disponível em Google Maps (direita). Acesso em 10 de março de 2019..... 66

**Figura 3.5.** (a), (b) Vila Isa, Governador Valadares, MG, Brasil. (c), (d) Santa Helena, Governador Valadares, MG, Brasil. Imagens do arquivo pessoal ..... 67

**Figura 3.6** (a) Animal contido fisicamente para coleta de amostra de sangue periférico em veia cefálica. (b) Localização de linfonodo poplíteo por meio de palpação para posterior coleta de material. Imagens do arquivo pessoal ..... 70

**Figura 3.7.** a) Material utilizado no diagnóstico sorológico. Na imagem é possível observar o leitor desenvolvido por Biomanguinos, ponteiros estéreis, DPP®LVC, tampão de amostra, tubo contendo soro de animal a ser testado e pipeta de 10µL. b) Exemplo de teste DPP®LVC negativo. c) Exemplo de teste DPP®LVC positivo. Seta azul: banda controle; Seta vermelha: banda teste ..... 72

**Figura 3.8.** Papel Whatman FTA® contendo sangue total e aspirado de linfonodo. No canto superior direito é possível observar os quatro círculos de 6mm de diâmetro cortados para extração. No centro, um microtubo contendo os círculos cortados ..... 73

**Figura 3.9.** Fitas de fluxo lateral utilizadas na leitura do RPA-LF exemplificando resultados (1) negativo, (2) fracamente positivo e (3) fortemente positivo. Delimitada em azul a banda controle e em vermelho a banda teste ..... 77

<b>Figura 3.10.</b> Padronização da RPA-LF para as amostras clínicas, utilizando diferentes concentrações de DNA. Delimitada em azul está a banda controle e em vermelho a banda teste. (a) 0,5µL de DNA: 1=negativo; 2 e 3= positivo fraco (b) 2µL de DNA: 1=negativo; 2=positivo moderado; 3= positivo forte. (c) 5µL: 1= positivo fraco; 2 e 3=positivo forte .....	78
<b>Figura 3.11.</b> Recipiente plástico vedado contendo fêmeas de flebotomíneos utilizado no xenodiagnóstico. Em (a) visão lateral e (b) visão frontal dos recipientes .....	80
<b>Figura 3.12. a)</b> Xenodiagnóstico sendo realizado em animal anestesiado. Nota-se pano preto cobrindo o pote contendo os flebotomos durante o procedimento. <b>b)</b> Ênfase no posicionamento do pote na orelha do animal durante o procedimento. Imagens do arquivo pessoal .....	81
<b>Figura 3.13.</b> Exemplos de dois resultados encontrados da qPCR com iniciadores para ssrRNA de dois diferentes pools de fêmeas de flebotomíneos. (a) Curva de amplificação. (b) Curva de dissociação.....	83
<b>Figura 4.1.</b> Distribuição dos 146 animais do Grupo 1 de acordo com sexo e raça.....	85
<b>Figura 4.2.</b> Distribuição dos 146 animais do Grupo 1 quanto a presença e tipo de sinal clínico. ....	86
<b>Figura 4.3. a.</b> Distribuição dos animais quanto a positividade para cada teste realizado. <b>b.</b> Distribuição dos animais positivos para pelo menos um dos testes (N=80). Nesta figura foram considerados positivos para qPCR de linfonodo, os animais que apresentaram amplificação para os iniciadores que codificam região do ssrRNA e/ou kDNA .....	87
<b>Figura 4.4.</b> Distribuição dos 111 animais do Grupo 2 de acordo com sexo e raça .....	90
<b>Figura 4.5.</b> Distribuição dos 111 animais do Grupo 2 de acordo com escore clínico. ....	90
<b>Figura 4.6.</b> Exemplo de leitura visual de teste DPP®LVC, representando resultado (a)negativo, (b)positivo fraco e (c)positivo forte .....	91
<b>Figura 4.7.</b> Exemplos de DPP®LVC positivos e a aplicabilidade do IR com o uso do leitor ou com leitura visual. Em (a) e (b), a mesma amostra de plasma de um mesmo cão foi submetida a realização do teste em momentos diferente. Nota-se que mesmo com leituras visuais e de intensidade de banda diferentes, a IR calculada se equipara. Já em (c) e (d), observa-se animais diferentes que apresentam banda teste semelhantes, mas quando utilizado a IR, fica evidenciado que animal c apresenta maior reatividade. T- banda teste (K28r), C- banda controle (Ptn A) e IR – índice de reatividade .....	93

**Figura 4.8.** Valores de DPP@LVC e qPCR com o escore clínico de cães com LVC. (a)Valores de Índice de reatividade (IR) obtidos com o DPP@LVC para os diferentes escores clínicos. (b)Números de correlatos de parasitos obtidos com qPCR para o gene *ssrRNA* de *Leishmania* no baço de cães com LVC para cada nível de escore clínico. Representado a Média com Desvio Padrão. Linha pontilhada representa o valor de corte para baixa e alta carga parasitária. Teste de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ . Cada ponto corresponde a um animal. Linhas contínuas representam a Mediana com 95% de intervalo de confiança. Linha pontilhada representa o valor de corte para baixa e alta carga parasitária ..... 95

**Figura 4.9.** Associação entre os valores de Índice de reatividade (IR) obtidos com o DPP@LVC e carga parasitária do baço de cães com LVC. Teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ . Cada ponto corresponde a um animal. Linhas contínuas representam a Mediana com 95% de intervalo de confiança. Linha pontilhada representa o  $IR=1$  ..... 96

**Figura 4.10.** Correlação entre os valores de Índice de reatividade (IR) obtidos com o DPP@LVC e a carga parasitária esplênica obtidas com qPCR para o gene *ssrRNA* de *Leishmania*. Teste de correlação de Spearman,  $p < 0,05$ . Cada ponto se trata de um animal. Linha contínua representa a correlação existente entre IR e carga parasitária. Linha pontilhada corresponde ao  $IR=1$ . Região cinza corresponde a área onde os animais com alta carga parasitária se encontram .....97

**Figura 4.11.** Relação entre as faixas de IR obtidos com o DPP@LVC e a carga parasitaria esplênica do Grupo 2. Teste de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ . Cada ponto corresponde a um animal. Linhas contínuas representam a Mediana com 95% de intervalo de confiança. Linha pontilhada representa o valor de corte para alta e baixa carga parasitária. Imagens exemplificam leitura visual dos intervalos de IR. .... 98

**Figura 4.12** Correlação entre os valores de IR obtidos com o DPP@LVC com a carga parasitária de linfonodos obtidas com qPCR para o gene *ssrRNA* de *Leishmania*. Cada ponto se trata de um animal. Linha contínua representa a correlação existente entre IR e carga parasitária. Linha horizontal pontilhada representa faixa de  $IR = 1,0$ . Teste de correlação de Spearman,  $p < 0,05$ . .... 100

**Figura 4.13.** Imagem da curva de dissociação obtida após qPCR com iniciadores para kDNA (vermelho) demonstrando padrão esperado para as amostras positivas. Em azul, padrão esperado para o iniciador 18S ..... 102

<b>Figura 4.14.</b> Curvas padrão utilizadas como referência para a quantificação parasitária em amostras de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> . (a) Curva construída com diluição seriada de DNA de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de cão para o gene HPRT. (b) Curva construída com diluição seriada de DNA de <i>L. infantum</i> para o gene ssrRNA de <i>Leishmania</i> sp. Ct ( <i>cycle threshold</i> ): número de ciclos de PCR em que é detectada a máxima fluorescência .....	104
<b>Figura 4.15.</b> Curvas padrão no ensaio de PCR em tempo real. (a) Gráfico de amplificação de 5 diluições seriadas do DNA de células caninas para o gene HPRT; (b) Gráfico de amplificação de 7 diluições seriadas do DNA de promastigotas de <i>L. infantum</i> para o gene ssrRNA; (c) Picos da curva de dissociação para o amplicon de HPRT (74,0°C) e para o amplicon de ssrRNA (79,0°C).....	105
<b>Figura 4.16.</b> Curva de amplificação obtida na qPCR com os iniciadores ssrRNA (vermelho) e HPRT (amarelo). .....	106
<b>Figura 4.17.</b> Curva de dissociação dos produtos obtidos na qPCR com os iniciadores HPRT (74,0°C) e ssrRNA (79,0°C). .....	106
<b>Figura 4.18.</b> Distribuição dos animais positivos em cada teste realizado (acima). Quantidade de animais positivos em mais de um teste (abaixo). .....	110
<b>Figura 4.19.</b> Distribuição dos animais positivos para pelo menos um dos testes utilizados. Os grupo de animais qPCR positivos, correspondem aqueles que apresentaram amplificação na PCR em tempo real com os iniciadores com alvo para ssrRNA e kDNA. Já os kDNA positivos, apresentaram amplificação apenas na PCR em tempo real com iniciadores para regiões do kDNA. Não houve casos de animais positivos apenas na PCR em tempo real utilizando iniciadores direcionados para ssrRNA .....	113
<b>Figura 4.20.</b> Manifestações clínicas observadas em cães acompanhados de janeiro a agosto de 2018 positivos para LVC residentes no bairro de Santa Helena, Governador Valadares. <b>a.</b> Dermatite ulcerativa em focinho; <b>b.</b> Alopecia; <b>c.</b> e <b>d.</b> Dermatite ulcerativa em ponta de orelha; <b>e.</b> Dermatite ulcerativa em lábio superior; <b>f.</b> linfonodomegalia. Imagens do arquivo pessoal .....	117
<b>Figura 4.21.</b> Distribuição das taxas de infecção mínima para o vetor em relação aos grupos de estudo. As barras indicam a média e desvio padrão de cada grupo. ....	122

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.1.</b> Incidência bruta e Óbitos por Leishmaniose Visceral no Brasil em 2017 .....	29
<b>Tabela 1.2.</b> Incidência bruta de Leishmaniose Visceral na Região Sudeste de 2008 a 2017	30
<b>Tabela 3.1.</b> Genes alvos e desenho dos iniciadores utilizados para PCR em tempo real para kDNA.....	73
<b>Tabela 3.2.</b> Genes alvos e desenho dos iniciadores utilizados para PCR em tempo real para ssrRNA .....	75
<b>Tabela 3.3.</b> Iniciadores e sonda utilizados no RPA-LF para <i>L. infantum</i> .....	77
<b>Tabela 3.4.</b> Genes alvos e desenho dos iniciadores utilizados na PCR em tempo real com amostras de flebotomíneos .....	82
<b>Tabela 4.1.</b> Prevalência aparente e verdadeira, sensibilidade, especificidade, acurácia diagnóstica, valores preditivos e razão de verossimilhança obtidos utilizando o qPCR com iniciadores para kDNA com amostras de linfonodo armazenado em RNA Later® como teste de referência para determinação da infecção .....	89
<b>Tabela 4.2.</b> Média, Mediana e Quartis dos valores de Índice de Reatividade obtidos nos diferentes escores clínicos do Grupo 2 .....	94
<b>Tabela 4.3.</b> Média, Mediana e Quartis da carga parasitária em parasitos/10 <sup>6</sup> células do hospedeiro obtidos nos diferentes escores clínicos do Grupo 2. ....	94
<b>Tabela 4.4.</b> Média, Mediana e Quartis dos valores de Índice de Reatividade obtidos em alta e baixa carga parasitária no Grupo 2. ....	96
<b>Tabela 4.5.</b> Relação entre positividade no teste DPP®LVC e no teste qPCR em amostras de cães com baixo escore clínico de área endêmica .....	99
<b>Tabela 4.6.</b> Frequência dos animais positivos do Grupo 2 para a qPCR distribuído nas faixas de IR (DPP®LVC) .....	101
<b>Tabela 4.7.</b> Frequência dos animais positivos do Grupo 1 para a qPCR divididos em apenas duas faixas de IR (DPP®LVC) .....	101
<b>Tabela 4.8.</b> Valores <i>Threshold cycle</i> (CT) obtidos nos animais considerados positivos do Grupo 1 (N=45) na qPCR com iniciadores para kDNA realizada com amostras de aspirado de linfonodo conservadas em papel de filtro. ....	103
<b>Tabela 4.9.</b> Carga parasitária obtida a partir da análise do aspirado de linfonodo com o iniciador ssrRNA .....	106
<b>Tabela 4.10.</b> Carga parasitária obtida a partir da análise do sangue total com o iniciador ssrRNA .....	108



<b>Tabela 4.11.</b> Relação entre positividade no teste qPCR com iniciador para ssrRNA e RPA-LF.....	110
<b>Tabela 4.12.</b> Relação entre positividade no teste qPCR com iniciador para kDNA e RPA-LF.....	111
<b>Tabela 4.13.</b> Relação entre positividade em pelo menos um dos testes de qPCR e RPA-LF.....	111
<b>Tabela 4.14.</b> Relação entre positividade em pelo menos um dos testes de DPP e RPA-LF.....	111
<b>Tabela 4.15.</b> Associação entre as faixas de IR e positividade no teste molecular .....	112
<b>Tabela 4.16.</b> Relação entre positividade para <i>L. infantum</i> no teste qPCR com iniciador para ssrRNA e RPA-LF nas amostras coletadas de cães do bairro de Santa Helena, Governador Valadares na segunda visita (abril de 2018) (n=40) .....	119
<b>Tabela 4.17.</b> Relação entre positividade para <i>L. infantum</i> no teste qPCR com iniciador para ssrRNA e RPA-LF nas amostras coletadas de cães do bairro de Santa Helena, Governador Valadares na terceira visita (agosto de 2018) (n=26) .....	120
<b>Tabela 4.18.</b> Média e desvio padrão das taxas de infecção mínima de flebotomíneos obtidas nos dois xenodiagnósticos .....	121
<b>Tabela 4.19.</b> Relação entre a positividade nos testes diagnóstico para <i>L. infantum</i> e capacidade de infectar o vetor nos cães residentes no bairro de Santa Helena, Governador Valadares em abril de 2018.....	123
<b>Tabela 4.20.</b> Combinação de testes rápidos para <i>L. infantum</i> aplicados na detecção de animais positivos no xenodiagnóstico residentes no bairro de Santa Helena, Governador Valadares em abril de 2018.....	123
<b>Tabela 4.21.</b> Associação entre as faixas de IR e positividade para <i>L. infantum</i> na RPA-LF obtida nos cães residentes no bairro de Santa Helena, Governador Valadares em abril de 2018. ....	124
<b>Tabela 4.22.</b> Distribuição dos animais positivos para o xenodiagnóstico e/ou RPA-LF de acordo com as faixas de IR obtidas nos cães residentes no bairro de Santa Helena, Governador Valadares em abril de 2018.....	124
<b>Tabela 5.1.</b> Recomendações de manejo dos cães em áreas endêmicas para Leishmaniose Visceral Canina.....	145

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 3.1.</b> Protocolo utilizado nas reações de RPA-LF do estudo. ....	79
<b>Quadro 4.1.</b> Avaliação da concordância entre os resultados dos testes realizados nos 132 animais do Grupo 1. Em azul, se encontram os resultados concordantes positivos e negativos .....	88
<b>Quadro 4.2.</b> Grupo A – animais residentes no bairro de Santa Helena , Governador Valadares, positivos para <i>L infantum</i> todos os testes realizados em janeiro de 2018 (n=5) .....	114
<b>Quadro 4.3.</b> Grupo B – animais residentes no bairro de Santa Helena , Governador Valadares, positivos para <i>L infantum</i> apenas no DPP®LVC realizado em janeiro de 2018 (n=8) .....	114
<b>Quadro 4.4.</b> Grupo C – animais residentes no bairro de Santa Helena , Governador Valadares, positivos para <i>L infantum</i> no RPA-LF realizado em janeiro de 2018 (n=19) .....	115
<b>Quadro 4.5.</b> Grupo D– animais residentes no bairro de Santa Helena , Governador Valadares, negativos para <i>L infantum</i> negativos em todos os testes realizados em janeiro de 2018 (n=8) .....	116

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**°C:** Graus Celsius

**µg:** Micrograma

**AS:** antisenso

**CCZ:** Centros de Controle de Zoonoses

**CEUA:** Comitê de Ética no Uso de Animais

**CFMV:** Conselho Federal de Medicina Veterinária

**CLWG:** *Canine Leishmaniasis Working Group*

**DAT:** Teste de Aglutinação Direta

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico

**DPP:** *Dual Path Plataform*

**EDTA:** Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

**ELISA:** Enzimed Linked Immunoabsorbant Assay

**FAM:** 6-carboxifluoresceína

**FAST:** Teste Rápido de Aglutinação Direta

**GAPDH:** Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de

**gp-63:** Glicoproteína-63

**HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana

**HPRT:** Hipoxantina fosforibosiltransferase

**HSP70:** *Heat Shock Protein 70*

**IC:** Intervalo de Confiança

**IFAT:** Teste de Imunofluorescência de Anticorpos

**IFI:** Teste de imunofluorescência

**IFN-γ:** Interferon gama

**IgG:** Imunoglobulina de cadeia gama

**IgG1:** Imunoglobulina de cadeia gama tipo 1

**IgG2:** Imunoglobulina de cadeia gama tipo 2

**IL-2:** Interleucina 2

**IL-4:** Interleucina 4

**IL-5:** Interleucina 5

**IL-10:** Interleucina 10

**IL-12:** Interleucina 12

**IL-17:** Interleucina 17

**iNOS:** Óxido Nítrico-Sintase Induzida  
**IOC:** Instituto Oswaldo Cruz  
**IR:** Índice de Reatividade  
**ITS-1:** *Internal Transcribed Spacer-1*  
**kDNA:** Ácido Deoxirribonucléico dos Minicírculos do Cinetoplasto de *Leishmania*  
**Kg:** Quilograma  
**LAMP:** *Loop-mediated Isothermal Amplification*  
**LIT:** *Liver Infusion Triptose*  
**LN:** Linfonodo  
**LPL:** Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose  
**LT:** Leishmaniose Tegumentar  
**LV:** Leishmaniose Visceral  
**LVC:** Leishmaniose Visceral Canina  
**LVH:** Leishmaniose Visceral Humana  
**m<sup>2</sup>:** Metro Quadrado  
**MAPA:** Ministérios da Agricultura Pecuária e Abastecimento  
**Min:** Minuto  
**mL:** Mililitro  
**mm:** Milímetro  
**MS:** Ministério da Saúde  
**NNN:** Meio de Cultura Neal, Novy, Nicolle  
**OR:** Razão de Chance  
**Pb:** Pares de Base  
**PBMC:** Células Mononucleares do Sangue Periférico  
**PCR:** Reação em Cadeia pela Polimerase  
**qPCR:** Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa  
**RPA-LF:** *Recombinase Polymerase Amplification - Lateral Flow*  
**rpm:** Rotações por minuto  
**S:** senso  
**SD:** Sem dados  
**SIDA:** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
**ssrRNA:** Subunidade 18S do RNA ribossomal de *Leishmania* sp.  
**SVS:** Secretaria de Vigilância em Saúde  
**TE:** Tampão tris-EDTA

**TGF- $\beta$** : Fator de transformação do crescimento

**TI**: Taxa de Infecção Mínima

**TNF- $\alpha$** : Fator de necrose tumoral

**TPC**: Teste de Perfusão Capilar

**Treg**: T regulador

**UTMB**: University of Texas Medical Branch

**VPN**: Valor Preditivo Negativo

**VPP**: Valor Preditivo Positivo

**$\alpha$ -MEM**: Meio Essencial Mínimo

**$\mu$ L**: Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1. As Leishmanioses .....	23
1.2. Ciclo Biológico. ....	32
1.3. Leishmaniose Visceral Canina.....	35
1.3.1. Vetores .....	35
1.3.2. Sinais Clínicos.....	37
1.3.3. Imunopatogenia.....	41
1.3.4. Diagnóstico Laboratorial.....	44
1.3.4.1. Diagnóstico Direto.....	46
1.3.4.2. Diagnóstico Indireto.....	52
1.3.5. Tratamento.....	54
1.3.6. Estratégias de Prevenção e Controle.....	57
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>61</b>
2.1. Objetivo Geral .....	61
2.2. Objetivos Específicos.....	61
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>62</b>
3.1. Aspectos Éticos .....	62
3.2. Desenho do Estudo.....	62
3.3. Caracterização da área de estudo. ....	65
3.4. Animais e Avaliação Clínica.....	68
3.5. Coleta e armazenamento das Amostras.....	69
3.6. Acompanhamento dos animais residentes na área endêmica.....	70
3.7. Teste Sorológico (DPP®LVC).....	71
3.8. Diagnóstico Molecular.....	72
3.8.1. Extração de DNA.....	72
3.8.2. PCR em tempo real com iniciadores para kDNA.....	73
3.8.3. PCR em tempo real com iniciadores para ssrRNA .....	74
3.8.4. <i>Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow</i> (RPA-LF). ....	76
3.8.4.1. Padronização do RPA-LF para amostras de cães de baixo escore clínico.....	76
3.8.4.2. Protocolo RPA-LF.....	79
3.9. Xenodiagnóstico. ....	79

3.9.1. Avaliação da capacidade de infectar o vetor.....	81
3.10. Análise Estatística.....	83
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>85</b>
4.1. Caracterização do grupo de estudo.....	85
4.1.1 Grupo 1.....	85
4.1.2. Grupo 2.....	90
4.2. Utilização do teste sorológico rápido DPP®LVC no diagnóstico dos cães assintomáticos .....	91
4.3. Interpretação dos resultados do teste sorológico rápido DPP®-LVC de forma semiquantitativa .....	92
4.3.1. Grupo 2.....	93
4.3.2. Grupo 1.....	99
4.4. Utilização da PCR quantitativa em tempo real como forma de diagnóstico molecular e determinação da carga parasitária.....	101
4.4.1. PCR quantitativa em tempo real com iniciadores para kDNA para diagnóstico molecular.....	101
4.4.2. PCR quantitativa em tempo real com iniciadores para ssrRNA para diagnóstico e determinação da carga parasitária .....	103
4.4.2.1. Padronização dos Ensaio de Quantificação Parasitária por qPCR.....	103
4.4.2.2. Diagnóstico e Carga Parasitária de aspirado de linfonodo e sangue de cães com baixo escore clínico para Leishmaniose Visceral Canina..	106
4.5. RPA-LF como método de diagnóstico rápido e aplicável aos postos de atendimento.....	108
4.6. Aplicabilidade do teste RPA-LF como teste parasitológico de fácil execução e complementar ao DPP®LVC.....	109
4.7. Acompanhamento de cães assintomáticos residentes em área endêmica para Leishmaniose Visceral Canina.....	112
4.7.1. Comparação dos resultados obtidos nos diferentes testes diagnósticos realizados durante o período de acompanhamento dos cães .....	117
4.8. Avaliação da capacidade de infectar o Vetor.....	120
4.9 . Aplicação do conceito do índice de reatividade e das faixas de reatividade no acompanhamento dos cães assintomáticos de área endêmica.....	123

<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>127</b>
5.1.	Caracterização da área de estudo, apresentações clínicas e comparação dos métodos diagnósticos da LVC.....	127
5.2.	Aplicação da análise semiquantitativa do DPP®LVC em área endêmica	133
5.3.	Aplicação da RPA-LF como método molecular alternativo nos postos de atendimento.....	137
5.4.	Importância dos cães assintomáticos em função da capacidade de infectar o vetor. 139	
5.5.	Acompanhamento e manejo de cães assintomáticos com LVC.....	141
5.6.	Recomendações no manejo de cães de áreas endêmicas de Leishmaniose Visceral Canina baseadas no conceito de índice de reatividade, positividade nos testes moleculares e capacidade do cão infectar o vetor.....	143
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>146</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>147</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>177</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. As Leishmanioses

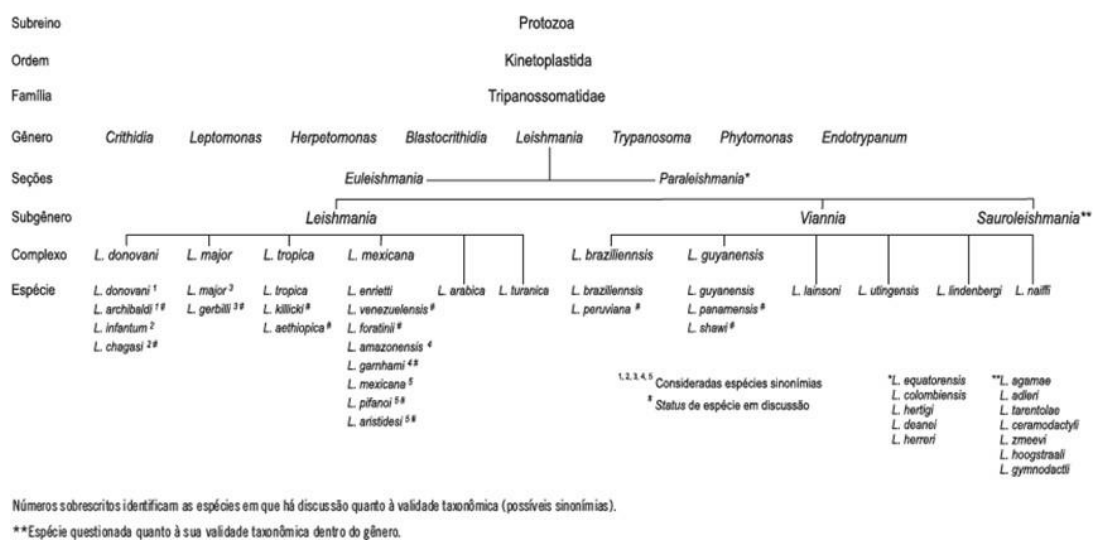
As Leishmanioses são um complexo de doenças que tem como agente etiológico, protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. Os parasitos são transmitidos pela picada de flebotomíneos infectados dos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Maroli et al., 2013).

Estes protozoários pertencem a Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, Gênero *Leishmania*. Segundo Cupolillo e colaboradores (2000), as espécies de *Leishmania* podem ter como hospedeiros vertebrados os mamíferos e diversos répteis. Com isso, foi proposta a divisão desses parasitos em duas seções, sendo uma delas dividida em três subgêneros. A primeira seção, chamada de *Euleishmania*, compreende os três subgêneros: *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)* e *L. (Sauroleishmania)*. Já a segunda seção, chamada de *Paraleishmania*, compreende diversas espécies de *Leishmania*, inclusive aquelas cuja sua classificação anterior era considerada incerta, como: *L. herreri*, que foi isolada de preguiças; *L. equatorensis*, descrita como parasita de mamíferos arbóreos, como preguiças e esquilos; *L. deanei* e *L. hertigi*, isoladas de porcos-espinhos; e *L. colombiensis*, que tem sido isolada de diversos hospedeiros, incluindo humanos (Cupolillo et al., 2000). São conhecidas cerca de trinta espécies, das quais vinte são consideradas patogênicas para os seres humanos. Dentro desses subgêneros, as espécies são classificadas em complexos, sendo no subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica* e *Leishmania (Leishmania) mexicana* (**Figura 1.1**). Já o subgênero *Viannia* tem como principais representantes os complexos *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. O subgênero *L. (Sauroleishmania)* inclui somente as espécies que tem os répteis como hospedeiro vertebrado (Cupolillo et al., 2014).

Mais recentemente, um estudo realizado por Espinosa e colaboradores propôs uma revisão taxonômica de *Leishmania* e *Endotrypanum*. Este trabalho, através de análises filogenéticas do gene HSP70 e GAPDH, descreve um novo subgênero dentro de *Leishmania*: *L. (Mundinia)* (Shaw, Camargo e Teixeira, 2016), além dos subgêneros *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)* e *L. (Sauroleishmania)*, ficando o gênero *Leishmania* então dividido em quatro subgêneros. Este novo subgênero foi criado para englobar o complexo *L. enriettii*, formado por uma cepa australiana de *Leishmania* sp., isolada de um canguru vermelho e caracterizada como *L. enriettii*, e por *L. martiniquensis* (Espinosa et al., 2016).

A maior parte das pessoas infectadas pelo parasita permanece assintomática, não desenvolvendo qualquer sintoma em sua vida. Portanto, o termo Leishmaniose refere-se ao fato de ficar doente devido a uma infecção por *Leishmania* e não ao simples fato de estar infectado pelo protozoário. As Leishmanioses são divididas em duas formas clínicas: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV).

A LT pode se apresentar com manifestações clínicas cutâneas ou mucosas. Essas manifestações clínicas podem ser causadas por diversas espécies, entretanto algumas relações já são conhecidas, tais como: as espécies *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* como causadoras da forma cutânea localizada, que corresponde a uma úlcera com bordas em moldura. Já a forma cutânea disseminada, caracterizada por múltiplas lesões em regiões não contíguas, está associada a infecção por *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis*. Em relação a manifestação cutânea difusa, que se difere da forma disseminada por apresentar múltiplas lesões nodulares ricas em parasitos, a infecção nas Américas tem como agentes causadores, as espécies do subgênero *Leishmania* e o complexo *Leishmania (Leishmania) mexicana*. Entretanto, no Brasil, a apenas *L. amazonensis* está envolvida nesses casos. A forma mucosa é frequentemente observada nas infecções causadas por *L. (Viannia)*, principalmente por *L. braziliensis*. A LV está associada as espécies do complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*. (Figura 1.1) (Cupolillo et al., 2014; Brasil, 2017).



**Figura 1.1.** Sistema de classificação taxonômica de espécies de *Leishmania*, considerando a descrição original das espécies e classificações propostas com base em critérios extrínsecos e a partir dos resultados obtidos por métodos bioquímicos e moleculares. (Adaptado de Cupolillo et al., 2014).

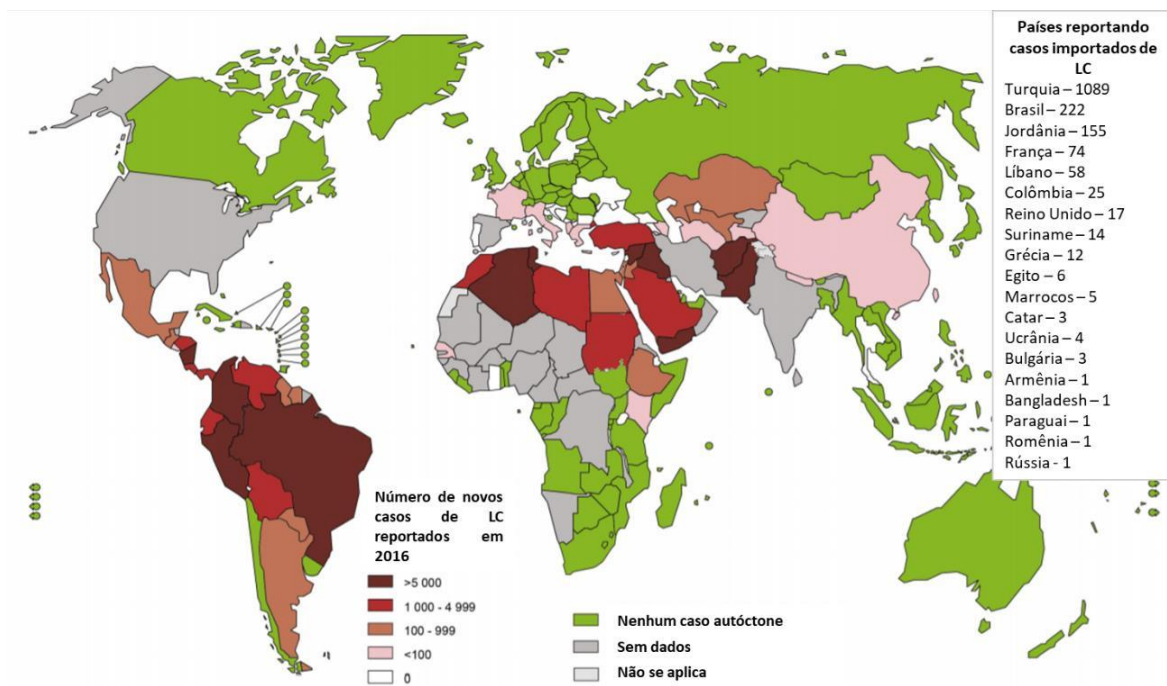
As Leishmanioses estão disseminadas em áreas tropicais e subtropicais, sendo encontradas em 98 países da América, Europa, África e Ásia (Alvar et al., 2012; WHO, 2018). Em uma estimativa realizada pela Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* – WHO), ocorrem de 700.000 a 1 milhão de novos casos de infecção por *Leishmania* sp. por ano, mas apenas uma pequena fração dos infectados pelos parasitos acabará desenvolvendo a doença.

A Leishmaniose Tegumentar é a forma mais comum das Leishmanioses e causa lesões cutâneas, principalmente úlceras, em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes durante toda a vida, que podem resultar em grave incapacidade ou estigma. Cerca de 95% dos casos de LT ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Em 2017, mais de 95% dos novos casos de LT ocorreram em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque e República Árabe da Síria. Estima-se que entre 600.000 e 1 milhão de novos casos ocorram em todo o mundo anualmente (WHO, 2019).

A Leishmaniose Mucosa leva à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Mais de 90% dos casos de Leishmaniose Mucosa ocorrem na Bolívia no Brasil, na Etiópia e no Peru (WHO, 2019).

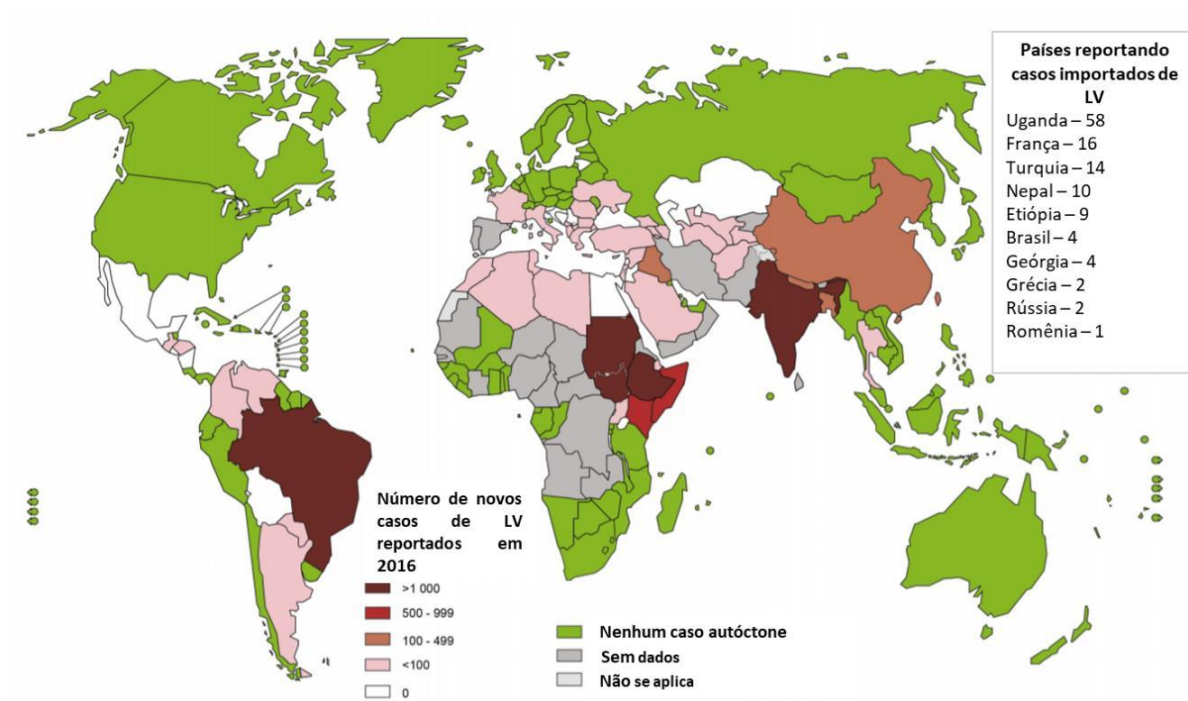
A Leishmaniose Visceral, também conhecida como calazar, é uma doença fatal se não for tratada em mais de 95% dos casos. É caracterizada por crises irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado, e anemia. A maioria dos casos ocorre no Brasil, na África Oriental e no Sudeste Asiático. Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorram em todo o mundo a cada ano, dos quais apenas cerca de 25-45% são relatados à OMS. Em 2017, mais de 95% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 10 países: Bangladesh, Brasil, China, Etiópia, Índia, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2019).

Os mapas disponibilizados pela Organização Mundial de Saúde (WHO) revelam o panorama da Leishmaniose Tegumentar (**Figura 1.2**) e Visceral (**Figura 1.3**) no ano de 2016.



**Figura 1.2.** Panorama da endemicidade da Leishmaniose Tegumentar no Mundo em 2016.

(Adaptado de WHO, 2018).

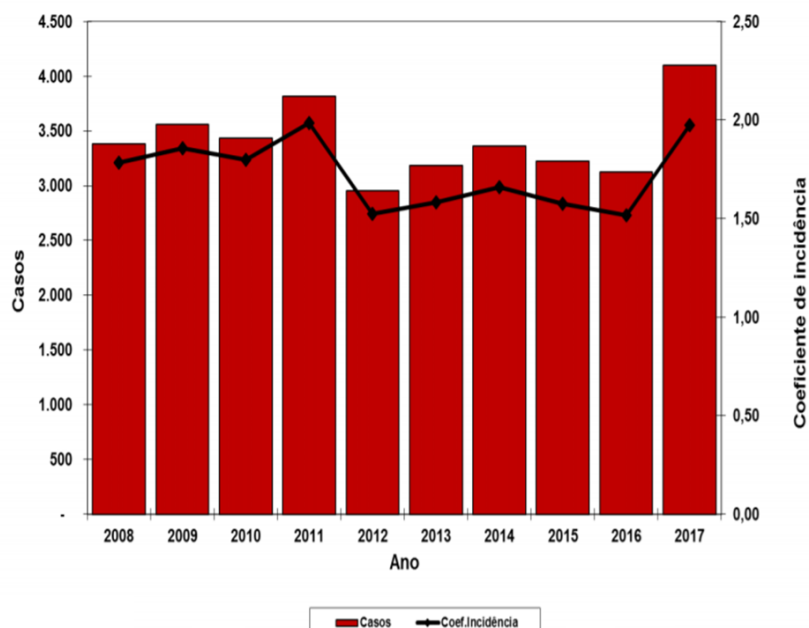


**Figura 1.3.** Panorama da endemicidade da Leishmaniose Visceral no Mundo em 2016.

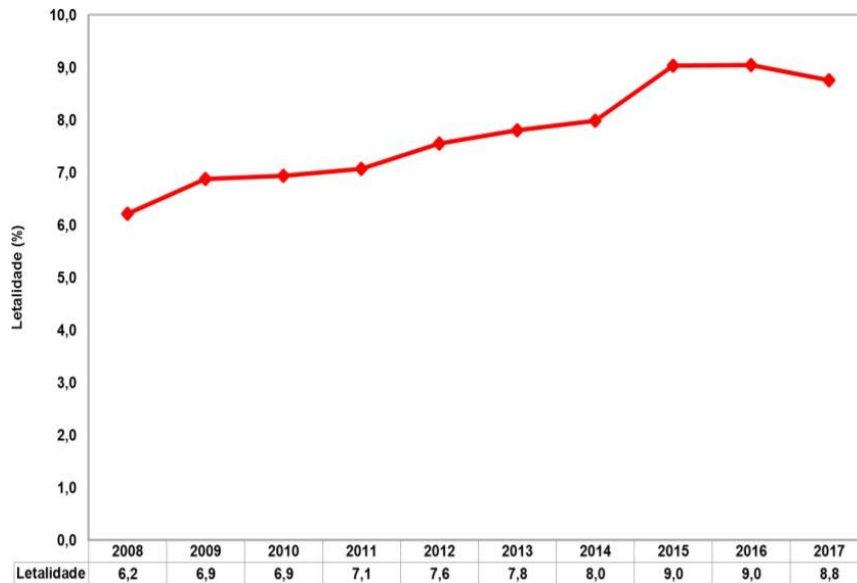
(Adaptado de WHO, 2018).

A Leishmaniose Visceral tem distribuição mundial. Ela é considerada a forma mais grave de Leishmaniose. Acredita-se que o parasita *Leishmania (Leishmania) infantum*, responsável pela doença no Brasil, foi introduzido no Novo Mundo no século XVI por cães domésticos (*Canis familiaris*) infectados que vieram como companheiros dos conquistadores de Portugal e da região do Mediterrâneo (Kuhls et al., 2011; Brazil, 2013). Após este primeiro contato, a doença se espalhou rapidamente através da América do Sul e Central em menos de 500 anos devido a constantes ondas de imigração europeia para o Novo Mundo e a presença de um vetor permissivo, *Lutzomyia longipalpis*. Quando os primeiros europeus chegaram, o vetor já era amplamente distribuído por todo o continente. O eclético comportamento alimentar de *Lu. longipalpis* significava que esses insetos não tinham dificuldade em se alimentar do cão recém-introduzido, tornando-os uma fonte para repasto sanguíneo, tornando-se um novo vetor para *Leishmania* importada (Brazil, 2013).

Segundo dados oficiais do Ministério da Saúde, a taxa de incidência da LV no Brasil variou de 1,78 a 1,98 casos/100.000 habitantes (**Figura 1.4**) com taxa de mortalidade variando de 6,2% a 8,8% (**Figura 1.5**) (Brasil, 2017).

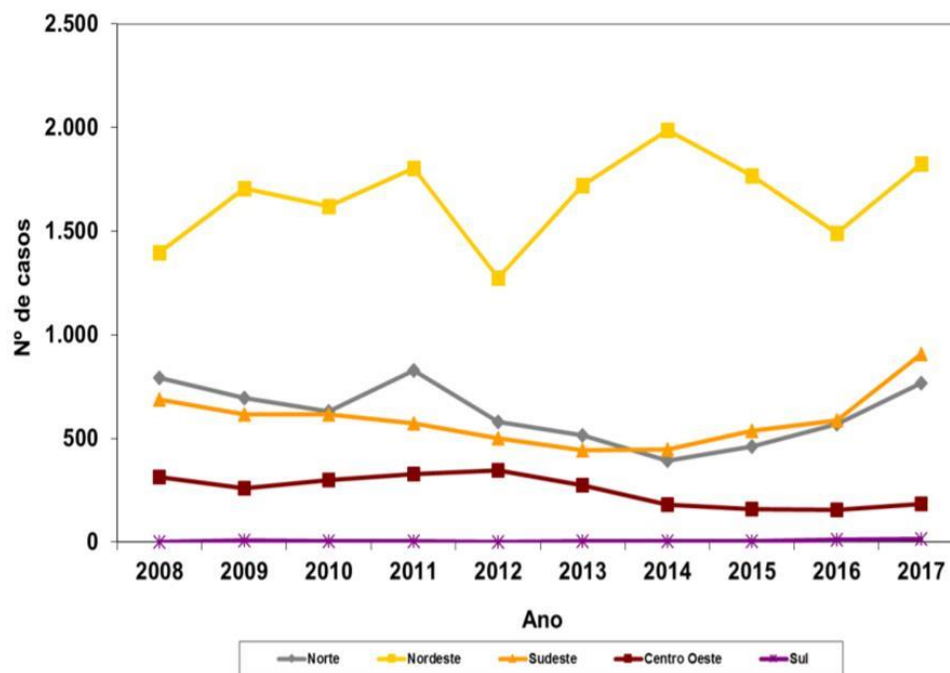


**Figura 1.4.** Casos e coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, Brasil, 2008 a 2017 (Brasil, 2017).

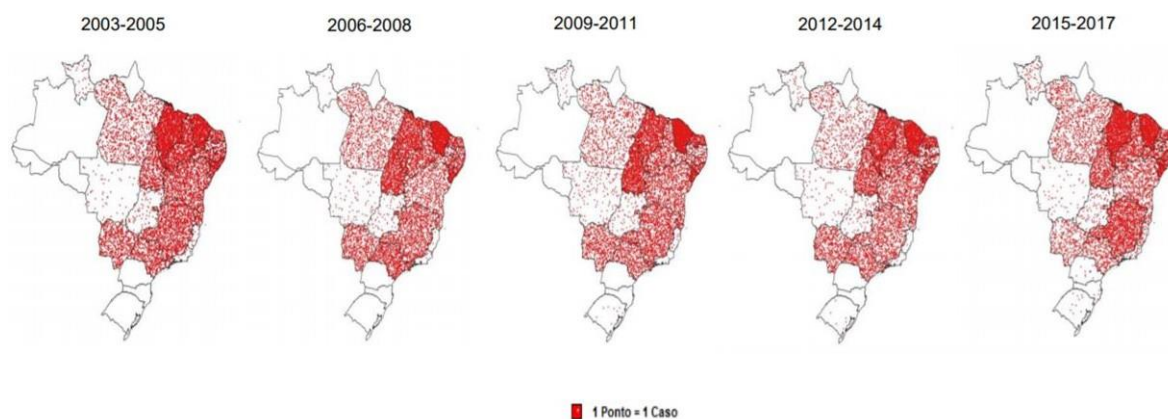


**Figura 1.5.** Taxa de letalidade por Leishmaniose Visceral, Brasil, 2008 a 2017 (Ministério da Saúde, 2017).

Ao realizar uma análise dos casos de LV no Brasil divididos por regiões, podemos notar que a região Nordeste sempre liderou o número de casos, seguida pela região Norte. Entretanto, a partir de 2014, esta foi ultrapassada pela região Sudeste (**Figura 1.6**). A distribuição dos casos por unidade federativa pode ser observada na **Figura 1.7** (Brasil, 2017).



**Figura 1.6.** Casos de Leishmaniose Visceral por regiões brasileiras, 2008 a 2017 (Ministério da Saúde, 2017).



**Figura 1.7.** Casos de Leishmaniose Visceral por regiões brasileiras, 2008 a 2017 (Ministério da Saúde, 2017).

Com base nas informações contidas no DATASUS, em 2017, foram confirmados 4.456 casos de LV no Brasil, com 338 pacientes evoluindo a óbito, sendo as maiores incidências nas regiões Nordeste e Sudeste (**Tabela 1.1**). Destacando os casos da região Sudeste, verificamos que embora a LV esteja presente em todos os quatro estados da região, a maior incidência ocorre no estado de Minas Gerais, seguido por São Paulo, sendo notado um aumento no número de casos no ano de 2017 (**Tabela 1.2**). Os dados mais recentes disponíveis no DATASUS de taxa de infecção da LV são de 2012, onde em Minas Gerais, a taxa foi de 1,85 casos/100.000 habitantes, São Paulo foi de 0,53 casos/100.000 habitantes, Rio de Janeiro e Espírito Santo foi de 0,03 casos/100.000 habitantes.

**Tabela 1.1.** Incidência bruta e Óbitos por Leishmaniose Visceral no Brasil em 2017.

Região	Número de Casos	Número de Óbitos	Letalidade (%)
Nordeste	2.199	174	7,9
Sudeste	1.096	112	10,2
Norte	861	34	3,9
Centro-Oeste	283	14	4,9
Sul	17	4	23,5
<b>Total</b>	<b>4.456</b>	<b>338</b>	<b>7,6</b>

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net

**Tabela 1.2.** Incidência bruta de Leishmaniose Visceral na Região Sudeste de 2008 a 2017.

Estado	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
<b>MG</b>	526	579	580	506	402	339	389	473	554	861
<b>SP</b>	307	231	226	234	255	203	192	176	176	192
<b>ES</b>	3	8	2	11	2	4	4	8	18	24
<b>RJ</b>	SD	6	2	5	5	9	6	7	8	19
<b>Total</b>	<b>836</b>	<b>824</b>	<b>810</b>	<b>756</b>	<b>664</b>	<b>555</b>	<b>591</b>	<b>664</b>	<b>756</b>	<b>1096</b>

SD: Sem dados

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net

Diferentemente da LV antroponótica do Velho Mundo causada pela *Leishmania donovani*, a Leishmaniose Visceral Americana é uma doença zoonótica causada pela *Leishmania infantum* e transmitida entre cães e seres humanos por flebotomíneos. O papel dos cães como hospedeiros-reservatórios da Leishmaniose Visceral urbana nas Américas já foi confirmado. Os cães são susceptíveis a LV, e por sua natureza gregária, a capacidade de locomoção e a associação com os humanos, constituem a principal fonte de infecção de *L. infantum* para os flebotomíneos, que são vetores rurais e urbanos (Dantas-torres et al., 2012; Otranto e Dantas-Torres, 2013).

Nos últimos 25 anos, tem se reportado um aumento no número de casos de Leishmaniose em todo mundo, sendo este atribuído a diversos fatores. A globalização e as mudanças climáticas são dois fatores que contribuíram para a disseminação da Leishmaniose em áreas não endêmicas (Shaw, 2007). Antes de 1980, quase todos os pacientes infectados eram de áreas rurais. Entretanto, quatro novos padrões surgiram na década de 1980: (i) transmissão de LV em áreas totalmente urbanizadas de cidades grandes; (ii) rápida disseminação no Nordeste e em várias cidades do Norte, Centro-Oeste e Sudeste; (iii) uma grande proporção de casos urbanos versus rurais; e (iv) o surgimento de epidemias urbanas em grande escala com ciclos de dez anos (Harhay et al., 2011). A transmissão limitada nas cidades pequenas já existia, e hoje a transmissão rural persiste. No entanto, há um contraste notável entre a ecologia da doença rural clássica em comparação com a ecologia na doença urbana mais recente (Harhay et al., 2011)

Durante as décadas de 1980 e 1990, a transição da doença do campo para as cidades poderia ser parcialmente explicada por seca e fome em regiões endêmicas, que provocaram emigração de humanos e cães infectados para as cidades (Costa, Pereira e Araújo, 1990). Esta



explicação é atraente porque também é apoiada pela observação de que a maior incidência nas cidades ocorre nos subúrbios urbanos e nos bairros pobres, onde a maioria dos migrantes rurais se concentram. Uma análise de um surto em Teresina (onde se acredita que a LV urbana tenha começado) utilizando uma especificação de modelo multinível mostrou que o status socioeconômico (pobreza) ampliou a associação com infecção canina antes e durante a epidemia humana (Werneck et al., 2007). Os mecanismos pelos quais a pobreza provavelmente amplifica a infecção incluem: a falta de estrutura e as más condições de saneamento. Dessa forma, a migração humana, grandes populações de canídeos urbanos (reservatório animal), e um vetor adaptável são as forças primárias para a urbanização da LV (Harhay et al., 2011).

Outro cenário que estamos presenciando atualmente é a infecção em indivíduos imunossuprimidos. Essa supressão pode ser causada por infecções virais, como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), levando a um aumento no número de registros de casos de LV em países onde a doença era rara, como França, Itália, Espanha e Portugal (Desjeux and Alvar, 2003; Shaw, 2007). No Brasil, as recentes alterações dos padrões de distribuição da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e da LV, como o deslocamento da infecção pelo HIV para áreas rurais e a urbanização da LV, associada ao aumento de casos de LV na faixa etária de 20 a 49 anos, são possíveis fatores correlacionados ao aumento do risco de coinfeção *Leishmania* e HIV. A coexistência dessas doenças aumenta a gravidade, visto que a LV acelera o desenvolvimento da SIDA em pacientes com HIV, e a SIDA aumenta o risco de LV de 100 a 1.000 vezes em áreas endêmicas (Leite de Sousa-Gomes et al., 2017).

A LV em humanos pode variar de uma doença assintomática ou oligossintomática, ou pode ter caráter progressivo e potencialmente fatal. Dentre os sinais clínicos observados, temos febre intermitente, perda de peso, hepatoesplenomegalia e / ou linfadenopatias, e pancitopenia, particularmente anemia (Bañuls et al., 2011; Ministério da Saúde, 2014).

A Organização Mundial de Saúde considera como principais fatores de risco as condições socioeconômicas, desnutrição, mobilidade da população e mudanças ambientais. A pobreza aumenta o risco de Leishmaniose. Habitações e condições sanitárias domésticas deficientes (como a falta de gestão de resíduos ou esgotos a céu aberto) podem aumentar os locais de criação e descanso de flebotomíneos, bem como o seu acesso aos seres humanos. Os flebotomíneos são atraídos por habitações lotadas, pois fornecem uma boa fonte de sangue. O comportamento humano, como dormir fora ou no chão, pode aumentar o risco. Já dietas sem proteína, ferro, vitamina A e zinco aumentam o risco de uma infecção progredir para uma doença completa (WHO, 2019).

As epidemias de Leishmaniose tanto cutânea como visceral são frequentemente associadas à migração e ao movimento de pessoas não imunes em áreas com ciclos de transmissão existentes. A exposição ocupacional, bem como o desmatamento generalizado, continuam sendo fatores importantes, assim como a urbanização e a incursão humana em áreas florestais (WHO, 2019).

As estratégias de controle da LV no Brasil consistem em identificação e tratamento dos casos humanos, controle populacional do vetor, eliminação dos reservatórios domésticos (cães) e atividades de educação em saúde (Ministério da Saúde, 2014). No entanto, a eficácia limitada desta abordagem não deteve a expansão da LV para novas regiões do Brasil, bem como outros países, como a Argentina (Costa, 2011; Nunes et al., 2008; Salomon et al., 2008).

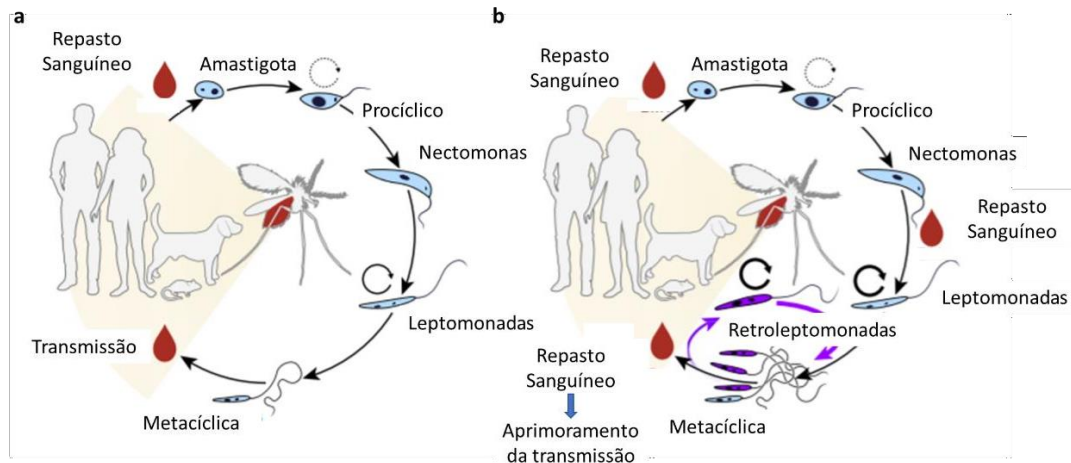
## 1.2. Ciclo Biológico

O ciclo de biológico da *Leishmania* se completa em dois hospedeiros, um flebotomíneo, que atua como hospedeiro invertebrado e vetor, responsável pela transmissão da forma promastigota ao hospedeiro vertebrado, e um mamífero, onde é encontrado a forma amastigota, que é intracelular (Gharbi et al., 2015; Sharma e Singh, 2008; Solano-gallego et al., 2011). Os flebotomíneos são os únicos vetores incriminados na transmissão da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), entretanto outras formas de transmissão são descritas, tais como transfusões sanguíneas com sangue oriundo de portadores da infecção (de Freitas et al., 2006; Owens et al., 2001), transmissão vertical (Boggiatto et al., 2011; Pangrazio et al., 2009; Rosypal et al., 2005) e transmissão venérea (Silva et al., 2009).

As fêmeas de flebotomíneos realizam o repasto sanguíneo para a maturação de seus ovos. Durante esse processo, pode ocorrer a ingestão de células contendo amastigotas (forma evolutiva arredondada e com flagelo não exteriorizado, encontrada no hospedeiro vertebrado) ou amastigotas livres juntamente com o sangue, tornando-se assim infectadas (Bates, 2007). Existe uma forte associação entre espécies de vetores de flebotomíneos e espécies de *Leishmania* transmitidas em função da presença de atividades enzimáticas específicas e ligantes presentes no intestino do inseto, que permitem apenas *Leishmania* spp. permanecerem ligadas a sua parede e replicarem sem serem excretadas do intestino junto com o sangue digerido (Volf et al., 2008). Como consequência, a transmissão vetorial ocorre apenas naquelas áreas onde espécies adaptadas (competentes) de vetores estão presentes (Killick-Kendrick, 1999; Volf et al., 2008). Não foi descrita a transmissão transovariana da *Leishmania* no vetor (Bates, 2007).

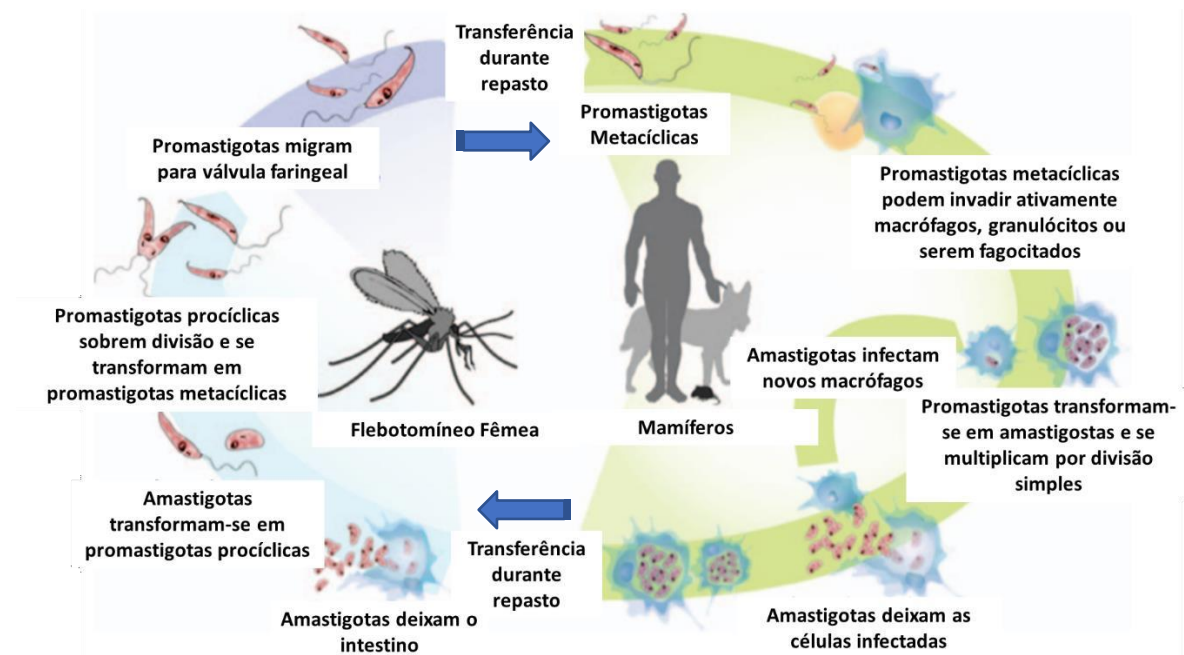
O intestino médio dos flebotomíneos é composto por um epitélio de camada única com uma borda em escova de microvilosidades que revestem o lúmen. Em contraste, o intestino anterior (incluindo a válvula estomodeal) e o intestino posterior (incluindo o triângulo pilórico) são revestidos por quitina (Dostálová and Volf, 2012). As amastigotas são ingeridas durante o repasto sanguíneo, chegam ao intestino médio onde se transformam em promastigotas procíclicas (forma evolutiva ovóide com flagelo externo curto e pouco móvel), que se replicam e se transformam em nectomonas longas. Durante a digestão do sangue, os parasitas são circundados pela matriz peritrófica, que é uma rede fibrosa, composta por quitina e uma série de proteínas associadas (Pimenta et al., 1997). Quando essa matriz é quebrada por enzimas presentes no intestino dos flebotomíneos, as nectomonas longas escapam pela abertura posterior e se ligam às microvilosidades do intestino médio. Esta adesão ocorre em um período de aproximadamente 72 horas, impedindo que os parasitas sejam digeridos e eliminados (Walters et al., 1992). O próximo estágio são nectomonas curtas capazes de se multiplicar, chamadas leptomonadas; estas se transformam em promastigotas metacíclicos infecciosos (forma delgada, pequena, com flagelo extenso e que não se multiplica) ou se fixam ao revestimento de quitina da válvula estomodeal como haptomonadas, aproximadamente cinco dias depois da alimentação (Lainson et al., 1987; Saraiva et al., 2005). No desenvolvimento tardio, massas de nectomonas secretam um proteofosfoglicano filamentosos que obstrui o intestino médio torácico. Isso, juntamente com a destruição da válvula, facilita o refluxo de parasitas quando o inseto faz um novo repasto sanguíneo. Nos subgêneros *Viannia* e *Sauroleishmania*, as formas haptomonadas também se ligam ao revestimento de quitina da região do piloro (Bates, 2018; Dostálová and Volf, 2012).

É descrito que repastos sanguíneos subsequentes a infecção do vetor afetam o desenvolvimento do parasito, onde uma segunda ingestão de sangue não infectado pelas fêmeas de flebotomíneos leva a uma desdiferenciação das promastigotas metacíclicas, consideradas o estágio de diferenciação terminal, para um estágio leptomonada-semelhante, a promastigota retroleptomonada. A metaciclogênese reversa ocorre após cada refeição de sangue subsequente, em que as promastigotas retroleptomonadas se multiplicam e diferenciam rapidamente para promastigotas metacíclicos, o que aumentam a infectividade do inseto, ou seja, uma nova refeição de sangue subsequente amplifica os poucos parasitos de *Leishmania* adquiridos pela alimentação em hospedeiros infectados em 125 vezes (Serafim et al., 2018) (**Figura 1.8**).



**Figura 1.8.** Ciclo biológico de *Leishmania* no flebotomíneo. (a) Ciclo de desenvolvimento clássico de parasitas de *Leishmania*. (b) As refeições de sangue subsequentes promovem o estabelecimento do parasito, desencadeando a desdiferenciação das promastigotas metacíclicas em retroleptomonadas multiplicativas, amplificando seus números e aprimorando a transmissão. (Adaptado de Serafim *et al.*, 2018.).

Quando um flebotomíneo fêmea infectado realiza o repasto sanguíneo, são regurgitadas promastigotas metacíclicas através da probóscide, atingindo a pele do hospedeiro vertebrado (Gharbi *et al.*, 2015; Sharma e Singh, 2008). As promastigotas são internalizadas por células dendríticas e macrófagos na derme e se transformam em amastigotas em 12-24 horas após a inoculação. O macrófago envolve o parasita em um fagolisossoma e tenta eliminá-lo através de uma cascata de metabólitos baseados em oxigênio, como o óxido nítrico e liberação de hidrolases lisossomais no interior do vacúolo parasitóforo. A *Leishmania* evade estes mecanismos de defesa não-específicos sobrevivendo e multiplicando no macrófago (Alvar *et al.*, 2004; Solano-Gallego *et al.*, 2009). A intensa multiplicação leva ao rompimento da célula e diversas formas amastigotas são liberadas no meio extracelular, levando a fagocitose por novos macrófagos e permitindo a continuidade do ciclo biológico (Gharbi *et al.*, 2015; Sharma e Singh, 2008). Os parasitas, então disseminam-se pelos sistemas linfático e vascular e infectam outros monócitos e macrófagos no sistema retículo-endotelial, resultando em infiltração da medula óssea, hepatoesplenomegalia e, por vezes, aumento dos gânglios linfáticos (linfadenopatia). Este estágio é de natureza crônica e pode continuar por meses a anos e até mesmo pelo tempo de vida sem sinais e sintomas visíveis, dependendo da suscetibilidade do hospedeiro e seu status imunológico (Sharma and Singh, 2008). A **Figura 1.9** demonstra o ciclo biológico da Leishmaniose de uma forma simplificada.



**Figura 1.9.** Ciclo biológico na Leishmaniose. (Adaptado de Harhay et al., 2011).

### 1.3. Leishmaniose Visceral Canina

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença zoonótica de notificação compulsória causada por protozoários da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* nas Américas, transmitida entre cães e seres humanos por flebotomíneos (Harhay et al., 2011; Ministério da Saúde, 2014). Entretanto, modalidades não vetoriais de transmissão são descritas, tais como a transmissão venérea, vertical e através da transfusão sanguínea (Oliveira, Alves e Silva Junior, 2015; Turchetti et al, 2014). Tais formas de transmissão justificam a presença da LVC em áreas onde o vetor não é detectado, como nos Estados Unidos (Turchetti et al, 2014; Vida et al, 2016.)

#### 1.3.1. Vetores

Os flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) são insetos pequenos que raramente excedem 3,5 mm no comprimento do corpo apresentando dimorfismo sexual na fase adulta. As fêmeas possuem a probóscide mais alongada em comparação a probóscide dos machos e apresentam uma estrutura envolvida com a ingestão sanguínea denominada cibário, que os machos não possuem (Maroli et al., 2013; Rangel et al., 1986). Tanto machos quanto fêmeas se alimentam de secreções açucaradas a partir de plantas, mas somente as fêmeas requerem pelo menos um repasto sanguíneo para completar o desenvolvimento dos ovos.

Os flebotomíneos podem se adaptar aos ambientes urbanos e alimentar em de diferentes animais domésticos, sendo encontrados dentro de casas e em grande concentração ao redor de

animais domésticos e de fazenda (Almeida et al., 2010; Benkova and Volf, 2007; Cerino et al., 2009; Harhay et al., 2011; Pita-pereira et al., 2008; Saraiva et al., 2011; Silva et al., 2010) Historicamente, duas espécies dominantes de flebotomíneos são associadas à transmissão de LV, a *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi* (Almeida et al., 2010; Ministério da Saúde, 2014). *Lu. longipalpis* é considerada o principal vetor de *L. infantum*, com *Lu. cruzi* aparecendo mais recentemente em vários municípios do Brasil (Almeida et al., 2010; dos Santos et al., 1998). Além das duas espécies mencionadas acima, outras menos importantes no ciclo natural da LV tem sido encontradas naturalmente infectadas com *L. infantum* (Carvalho et al., 2008; Harhay et al., 2011; Pita-Pereira et al., 2008). Os flebotomíneos podem se adaptar a temperaturas variadas e serem encontrado dentro das casas e em alta concentração em torno de animais domésticos e de criação (Harhay et al., 2011)

A *Lu. longipalpis* adaptou-se a ambientes urbanos e rurais, se alimenta preferencialmente de cães domésticos, que devido sua alta susceptibilidade a infecção, sua natureza gregária, a capacidade de locomoção e a forte associação com os seres humanos, são os principais reservatórios domésticos da Leishmaniose Visceral (LV) (Dantas-Torres et al., 2012; Harhay et al., 2011). Em áreas endêmicas da América Latina, a presença de cães aumenta significativamente o risco de seres humanos desenvolverem a LV (Belo et al., 2013).

Devido à variabilidade na resposta imune à infecção, os cães com LVC podem se apresentar assintomáticos ou com forma progressivamente sintomática da doença (Ciaramella et al., 1997; Rallis et al., 2005). Em geral, a capacidade de transmitir parasitas a flebótomos tem sido associada a gravidade da doença. Vários estudos relataram que a maioria dos cães sintomáticos é capaz de transmitir parasitas a flebotomíneos em áreas endêmicas, e que esses animais são mais infecciosos do que cães assintomáticos, confirmando sua importância no ciclo de transmissão da LV (Courtenay et al., 2002; Guarga, Lucientes e Periba, 2000; Costa-Val et al., 2007). Por outro lado, outros estudos demonstraram que a capacidade de um determinado cão de transmitir parasitas aos vetores independe de sua apresentação clínica da LVC: assintomática, oligossintomática ou polissintomática (Guarga, Lucientes e Periba, 2000; Molina et al., 1994) A estreita relação com humanos e seu papel na manutenção do ciclo do parasita são os principais fatores para que os cães sejam o principal alvo para o controle da Leishmaniose Visceral Humana (LVH) (Ministério da Saúde, 2014; Moreno e Alvar, 2002).

A frequência e a disseminação da infecção por *L. infantum* em diferentes populações caninas dependem de vários fatores, incluindo: (i) a duração da estação de transmissão; (ii) preferências alimentares de vetores; (iii) densidade vetorial; (iv) densidade e suscetibilidade da população canina; (v) estilo de vida do cão (por exemplo, ao ar livre vs interior e rural vs vida urbana) e grau

de exposição a vetores; (vi) presença de outros reservatórios; e (vii) atitudes dos donos de cães em relação à prevenção (Baneth et al., 2008; Dantas-Torres et al., 2012).

No Novo Mundo, os caninos silvestres também são frequentemente encontrados infectados por esse parasita, particularmente os cachorros do mato (*Cerdocyon thous*), que são expostos aos flebotomíneos em áreas endêmicas (Gomes et al., 2007). Como ocorre com os cães domésticos, os caninos silvestres são altamente suscetíveis à infecção por *L. infantum* e podem eventualmente morrer de LVC (Madeira et al., 2009). Outros animais silvestres como pequenos roedores e gambás (*Didelphis* spp.) também são considerados como potenciais reservatórios do parasita na América do Sul (Lainson e Rangel, 2005), entretanto o impacto sobre o ciclo de transmissão é desconhecido (Dantas-Torres et al., 2012; Ribeiro et al., 2018).

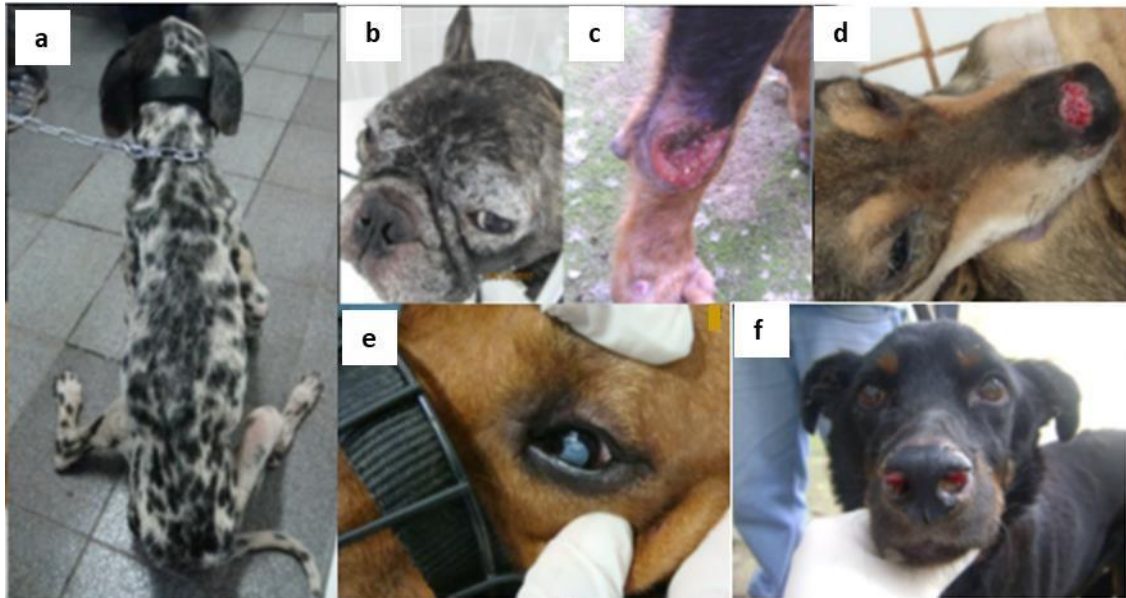
### 1.3.2. Sinais Clínicos

A presença e a intensidade dos sinais clínicos são determinadas por um conjunto de fatores que envolvem a cepa do parasita, a genética e estado imunológico do hospedeiro. Por isso encontramos desde cães que são capazes de controlar a infecção por muitos anos, sem o aparecimento de sinais clínicos, e às vezes podendo até evoluir para cura espontânea. Como também, há outros animais que apresentam evolução rápida e doença grave, ou curso progressivo que leva a morte (Ribeiro et al., 2018).

A Leishmaniose Visceral canina é uma doença multissistêmica com sinais clínicos variáveis, acometendo, timo, linfonodos, baço, fígado, rins, trato gastrointestinal, trato genital, medula óssea além do sistema nervoso central (Baneth et al., 2008; Cardoso et al., 2009; Silva et al., 2013). O acometimento de múltiplos órgãos se dá devido ao tropismo observado em algumas espécies de *Leishmania* para vísceras, denominadas espécies viscerotrópicas, como *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*. Os mecanismos pelo qual a visceralização ocorre ainda não é conhecido. Nas espécies dermatotrópicas a visceralização pode ocorrer, e normalmente, é devido a imunossupressão levando a uma infecção multissistêmica (Morgado et al., 2016; Oliveira et al., 2013).

Os cães com LVC desenvolvem uma doença progressiva, caracterizada por linfadenopatia, hepato-esplenomegalia, perda de peso, dermatite, crescimento patológico das unhas (onicogribose), anemia, hemorragia e, por fim, a morte (Cardoso et al., 2009; Lima et al., 2014; Cavalcanti et al., 2015). Os sinais clínicos detectados na maior parte dos cães são: má condição corporal (**Figura 1.10a**), atrofia muscular generalizada, linfonodomegalia e excessiva descamação da pele. Os achados histopatológicos típicos são processos inflamatórios granulomatosos associados à presença de amastigotas de *Leishmania* em macrófagos (Baneth et al., 2008). Por apresentar sinais clínicos inespecíficos, em muitos casos, principalmente em áreas não endêmicas, pode ser

confundidas com uma variedade de outras doenças que acometem os cães (Ciaramella et al., 1997; Rallis et al., 2005).



**Figura 1.10.** Manifestações clínicas comumente encontradas em cães com Leishmaniose Visceral. (a) Caquexia, (b) Dermatite exfoliativa, (c) Úlceras cutâneas, (d) Lesões cutâneas no focinho, (e) Uveíte e (f) Epistaxe. Imagens arquivo Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose (LPL).

As alterações dérmicas LVC incluem dermatite esfoliativa (**Figura 1.10b**), ulcerativa (**Figura 1.10c e 1.10d**), nodular e pustular (Koutinas et al., 1999; Papadogiannakis et al., 2005; Solano-Gallego et al., 2004). Em estudos que avaliaram a matriz extracelular na pele de cães sintomáticos, observou-se uma diminuição no colágeno tipo I e um aumento nas fibras de colágeno tipo III, proporcionais à gravidade da lesão da pele e destruição tecidual (Giunchetti et al., 2006). Frequentemente, infecções bacterianas superficiais e/ou profundas, principalmente por *Staphylococcus* spp., ou fúngicas, por *Malassezia pachydermatis*, são relatadas, as quais induzem dermatite pustulosa caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório histolinfoplasmocitário (Gharbi et al., 2015). A alopecia difusa com ausência de prurido pode estar presente associada a seborreia seca com apresentação localizada (principalmente na região dorso-lombar) ou disseminada por todo o corpo (Blavier et al., 2001). O cão pode apresentar queratose folicular e, em alguns casos, paraqueratose com infiltrado inflamatório, às vezes associado a histiócitos, plasmócitos e macrófagos, sendo possível a presença de amastigotas. A hiperqueratose pode estar presente (Gharbi et al., 2015). As úlceras cutâneas ou mucosas



multifocais podem estar associadas à necrose das camadas epidérmica e dérmica, havendo um infiltrado polimórfico ao redor da necrose, consistindo de uma mistura de histiócitos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos infectados por amastigotas de *Leishmania* (Gharbi et al., 2015). Pode haver a presença de nódulos com várias formas, desde pápulas simples até nódulos tumorais com linfadenopatia periférica. Os nódulos podem ser generalizados ou localizados no espaço interdigital. Em alguns casos, eles se tornam ulcerados (Blavier et al., 2001). Foi relatada dermatite nodular com infiltrado inflamatório, contendo macrófagos com alta carga parasitária e alguns linfócitos e plasmócitos (Gharbi et al., 2015).

As lesões dérmicas na LVC não são necessariamente provocadas por uma inflamação em resposta à presença física de parasitas na pele, porque mesmo a pele íntegra e de aparência normal também abriga um grande número de parasitas em cães sintomáticos, sendo descritas cargas parasitárias semelhantes em peles de cão com lesões macroscópicas e em peles íntegras de cães sintomáticos (Papadogiannakis et al., 2005; Solano-Gallego et al., 2004). Um aumento no comprimento das unhas (onicogrifose) pode tornar-se aparente (Gharbi et al., 2015).

O aumento dos linfonodos é um dos sinais mais frequentes na LVC, eles se tornam móveis e indolores. A linfonodomegalia pode ocorrer precocemente durante o curso da doença e, em alguns casos, pode ser o único sinal clínico (Ciaramella et al., 1997; Gharbi et al., 2015). Ela é causada pelo aumento do número e tamanho dos folículos linfóides e a acentuada hipertrofia e hiperplasia de macrófagos medulares (Lima et al., 2004). A carga parasitária em linfonodos aumentados frequentemente não é correlacionada com o tipo e gravidade das lesões em outros órgãos (Lima et al., 2004; Mylonakis et al., 2005).

Em geral, uma intensa reação inflamatória crônica, consistindo em infiltração por células mononucleares (macrófagos, plasmócitos e linfócitos), ocorre no fígado e no baço. Uma reação inflamatória crônica caracterizada por formações de granuloma lobular com presença de fibrose no fígado já foram descritas anteriormente em cães infectados (Silva et al., 2013). O baço é um dos principais órgãos afetados na LVC, apresentando desorganização da polpa branca esplênica, associado a alterações na matriz extracelular esplênica, atrofia folicular com intensa plasmocitose, sendo essa alteração associada a perda no controle da carga parasitária e progressão da doença (Silva et al., 2018). A esplenomegalia é associado ao aumento da celularidade de monócitos e macrófagos e alterações na estrutura da microvasculatura e aumento de fibras reticulares (Alexandre-Pires et al., 2006).

Os rins são afetados em praticamente todos os cães com LVC, podendo a doença renal ser a única anormalidade aparente em cães infectados. A doença renal pode progredir da proteinúria assintomática à síndrome nefrótica ou insuficiência renal crônica com

glomerulonefrite, nefrite tubulointersticial e amiloidose, sendo a glomerulonefrite frequentemente associada à deposição renal de complexos imunes (Koutinas et al., 1999; Nieto et al., 1992). Apesar da alta prevalência de patologia renal, azotemia com elevação dos níveis séricos de creatinina e ureia típicas de insuficiência renal são evidentes somente quando a maioria dos néfrons é disfuncional, o que acontece bastante tarde durante a progressão da doença (Baneth et al., 2008).

As lesões articulares e ósseas podem estar presentes em cães (Agut et al., 2003; Baneth et al., 2008). Um estudo sobre lesões ósseas na LVC relata a presença de anormalidade na marcha, presença de poliartrite erosiva e não erosiva com presença de amastigotas no líquido sinovial (Agut et al., 2003). Os ossos afetados apresentam lesões proliferativas intramedulares e em periósteo com frequente osteólise cortical e medular (Baneth et al., 2008). Atrofia muscular progressiva associada a polimiosite crônica pode ser encontrada, sendo caracterizada pela presença de infiltrados mononucleares com amastigotas, vasculite neutrofílica e complexos imunes nos tecidos musculares em conjunto com anticorpos séricos anti-fibra muscular (Vamvakidis et al., 2000).

As lesões oculares quando presentes em cães com LVC, podem se tratar de uveíte anterior (**Figura 1.10e**), conjuntivite, ceratoconjuntivite seca, blefarite ou uma combinação destes. Na ceratoconjuntivite seca, o infiltrado inflamatório localizado em torno dos ductos lacrimais causam retenção da secreção e diminuição na produção de lágrimas (Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999; Naranjo et al., 2005; Pena et al., 2000)

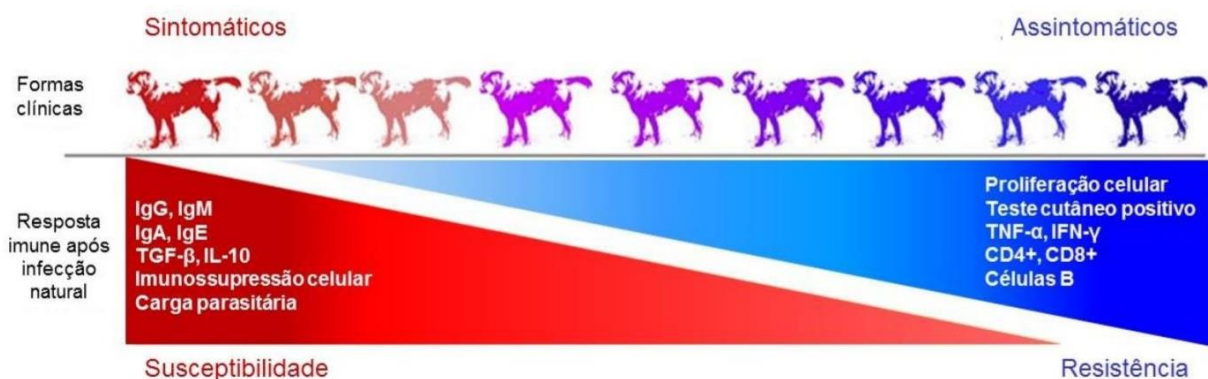
O trato genital também é acometido, sendo isolado o parasito no sêmen canino, com vários outros estudos demonstrando que o parasita apresenta tropismo para o sistema reprodutivo masculino de cães produzindo uma resposta imune local e favorecendo o aparecimento de *L. infantum* no sêmen dos animais. Os cães machos naturalmente infectados por *L. infantum* não revelam alterações macroscópicas nos órgãos genitais, embora existam lesões histológicas. As lesões são caracterizadas por reações inflamatórias crônicas em todos os órgãos pertencentes a esse sistema, atrofia degenerativa do epitélio seminífero, fibrose intersticial com afinamento do epitélio epidídimo, prostatite e azoospermia. Além das lesões nos órgãos genitais internos, também foram relatados amastigotas de *L. infantum* na glândula do pênis do cão associadas ao tumor venéreo transmissível, proporcionando reação inflamatória com predominância de macrófagos nessas regiões. Esses estudos tornam mais forte a possibilidade de transmissão sexual de LV. Nas fêmeas, a dermatite vulvar foi a única lesão importante, sugerindo que *L. infantum* não apresenta tropismo pelo sistema genital feminino (Silva et al., 2009). Contudo, outros estudos mostraram que todos os órgãos do sistema genital

de cadelas naturalmente infectadas por *L. infantum*, com exceção dos ovários, apresentam lesões com altos níveis de carga parasitária em todos os órgãos (Oliveira et al, 2015).

As alterações na hemostasia primária e secundária e ulceração tecidual estão associadas a epistaxe (**Figura 1.10f**), hematúria e diarreia hemorrágica na LVC. Os distúrbios hemostáticos descritos no LVC incluem anomalias de agregação plaquetárias que levam à disfunção plaquetária, baixo número de plaquetas, diminuição das atividades dos fatores de coagulação e fibrinólise. Epistaxe profusa pode aparecer como o único sinal de apresentação da doença e pode ser uma causa de morte devido a perda sanguínea incontrolável. O mecanismo envolvido nesse caso pode ser uma rinite piogranulomatosa ou linfoplasmocitária (com ou sem ulceração), trombocitopenia e hiperglobulinemia (Juttner et al., 2001). A anemia está presente na maioria dos cães sintomáticos por causa de insuficiência renal crônica ou diminuição da eritropoiese causada por doença crônica e pode ser agravada pela perda de sangue ou destruição imunomediada de hemácias (Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999).

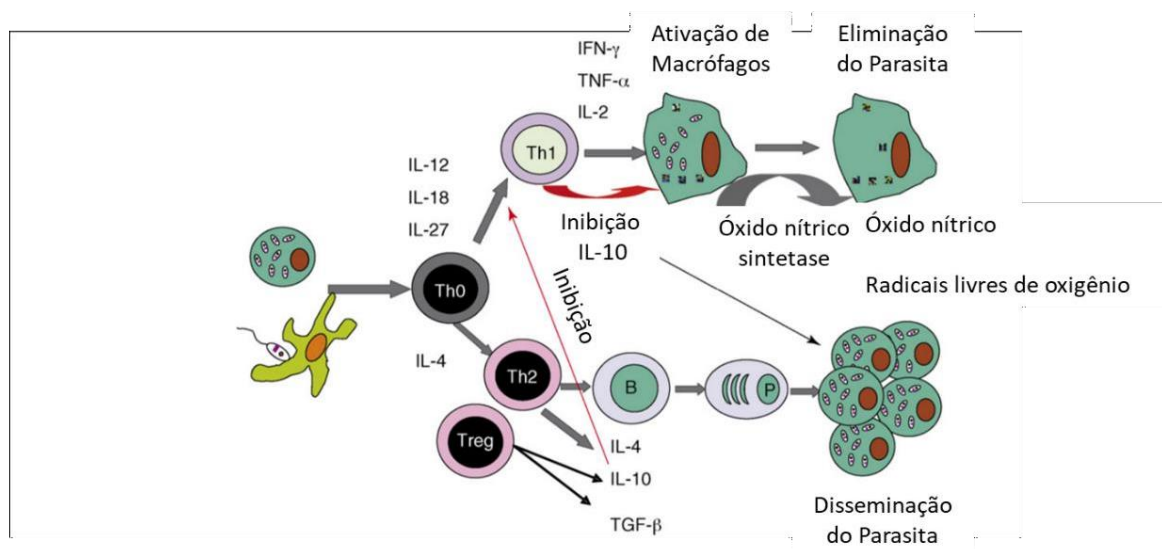
### 1.3.3. Imunopatogenia

A história natural da Leishmaniose Visceral canina irá depender de vários fatores, por ex. carga parasitária, imunidade mediada por células, resposta humoral e expressão de citocinas. A importância relativa desses fatores em cada indivíduo e os diferentes equilíbrios estabelecidos entre todos eles resultam no aparecimento de um espectro dinâmico de formas clínicas associadas a infecção natural que varia de animais resistentes e assintomáticos a doenças graves em animais suscetíveis. Além disso, esses parâmetros têm um valor preditivo para o progresso da infecção e, portanto, devem ser levados em conta como características de resistência e suscetibilidade à Leishmaniose Visceral Canina (**Figura 1.11**) (Reis et al., 2010).



**Figura 1.11.** Marcadores de resistência e suscetibilidade na Leishmaniose Visceral Canina. A suscetibilidade e resistência ao desenvolvimento da Leishmaniose Visceral Canina dependem da resposta imune desencadeada no cão após infecção natural. (Adaptado de Reis et al., 2010).

A resposta imunológica em cães apresenta dois perfis, o perfil de células Th1 e Th2 (Chamizo et al., 2005). As respostas protetoras foram associadas a baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* e à ativação da resposta imune celular específica, incluindo a produção de citocinas Th1, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2. Ocorre ativação da ação microbicida de macrófagos e produção de óxido nítrico, que agem no controle da carga parasitária. Esse perfil associado à resistência do animal frente a infecção foi principalmente observado em cães assintomáticos (Barbiéri, 2006; Pinelli et al., 1994). Por outro lado, o perfil de susceptibilidade é caracterizado por uma resposta imune humoral acentuada não protetora e uma imunidade mediada por células reduzida ou deprimida com uma resposta mista de citocinas Th1 e Th2. Esse perfil é observado em cães sintomáticos, onde ocorre a progressão da doença, sendo marcante perfil de resposta Th2, com expressão de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$  (Rodríguez-Cortés et al., 2016). Como a resposta humoral não é eficaz contra o parasito intracelular, a sua replicação é favorecida e há aumento da carga parasitária (Barbiéri, 2006; Rodríguez-Cortés et al., 2016) (**Figura 1.12**).



**Figura 1.12.** Visão geral da interação complexa entre as respostas Th1 e Th2 na Leishmaniose Visceral Canina. As respostas mistas Th1 e Th2 ocorrem em cães infectados, e assume-se que o equilíbrio entre essas respostas se inclina na direção Th2 em cães que evoluem para a doença clínica, enquanto uma atividade Th1 de proteção mais forte direciona a resistência. As citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  estão relacionadas com ativação de macrófagos e a morte de parasitas por NO (resposta Th1). Por outro lado, IL-10, TGF- $\beta$  e IL-4 estão envolvidos na disseminação do parasita associada à atividade aumentada de células B (B) e plasmócitos (P) e hiperglobulinemia (resposta Th2). As respostas Th1 são reguladas negativamente pela IL-10 produzida pelas células T reguladoras (Treg). A IL-10 também é produzida por células da linhagem Th1, como moduladora da imunopatologia secundária

desencadeada pela infecção, mas também previne a imunidade estéril e permite a persistência de infecção de baixo nível. (Adaptado de Baneth et al., 2008).

Recentemente, foi demonstrado o papel do perfil Th17 na imunopatologia da LVC (Hosein et al., 2015). É descrito uma redução nas células Th17 acompanhada de progressão da doença, o que sugere a importância dessas células no controle da carga parasitária. Além disso, a redução da expressão de IL-17 na LVC foi correlacionada com a expressão reduzida de IFN- $\gamma$  e iNOS. Estes achados sugerem que uma resposta mista de Th1/Th17 pode desempenhar um papel na restrição do crescimento do parasito através da ativação do iNOS e melhorar a resistência dos cães à LVC (Nascimento et al., 2015).

Assim, a infecção por *Leishmania* em cães pode se manifestar como uma infecção subclínica, uma doença autolimitante ou uma doença grave (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Em cães, essas situações opostas de apresentação clínica serão determinadas por: (1) imunidade protetora mediadas por células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN-  $\gamma$ , IL-12 e TNF-  $\alpha$  que irão induzir a atividade anti-*Leishmania* nos macrófagos, correspondente a resposta Th1 e (2) suscetibilidade à doença que está associada com a produção de uma resposta imune humoral não protetora e uma imunidade reduzida ou deprimida, mediada por células pertencente a uma resposta mista Th1 e Th2 (Alvar et al., 2004; Baneth et al., 2008). Dentro desse espectro, a doença clínica pode variar de uma dermatite papular leve associada a imunidade celular específica e baixas respostas humorais (Ordeix et al., 2005) a uma doença grave caracterizada por dano renal com glomerulonefrite devido à deposição do complexo imune associada a resposta humoral maciça e alta carga parasitária (Costa *et al.*, 2003).

A LVC frequentemente está associada à resposta humoral, que não é protetora e representa falha no controle da infecção. Os níveis de imunoglobulinas específicas para *Leishmania* detectadas em cães sintomáticos são maiores do que aquelas detectadas em cães assintomáticos, estando esses níveis associados ao estado clínico e carga parasitária tissular. Os níveis das subclasses de IgG canina, IgG1 e IgG2, foram estudados extensivamente na tentativa de estabelecer uma correlação entre o nível da subclasse, o tipo de resposta envolvida e desfecho clínico da infecção sem sucesso. Investigações empregando anticorpos monoclonais para IgG1 e IgG2 caninos mostraram aumento na produção de ambas as subclasses durante a LVC natural e experimental sem indicar um uso prático para estes níveis (Quinnell *et al.*, 2003; Strauss-Ayali, Baneth e Jaffe, 2007).

### 1.3.4. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico é geralmente realizado por dois motivos principais: para confirmar "doença", por exemplo, descobrir se um cão com sinais clínicos e/ou anormalidades clinicopatológicas compatíveis com LVC realmente tem a doença, e investigar a presença de "infecção" para estudos epidemiológicos, como por exemplo, identificar cães clinicamente saudáveis, mas capazes de transmitir a doença (Solano-Gallego et al., 2009).

Um diagnóstico precoce permite um melhor prognóstico para o tratamento, além da possibilidade de interromper o ciclo de transmissão do parasito para o vetor, que poderia ocorrer no caso de animais falso-negativos. Adicionalmente, um método diagnóstico com boa especificidade é imprescindível, visando evitar a eutanásia desnecessária de cães que possuem resultados de testes falso-positivos (Gharbi et al., 2015).

Entretanto, é difícil diagnosticar a LVC clinicamente, devido às suas expressões polimórficas e à presença de sinais clínicos comuns a outras doenças. Além disso, existe um grande número de cães assintomáticos, o que faz com que as investigações constantes, principalmente em áreas endêmicas sejam justificadas. A possibilidade da ausência de sintomas em animais infectados associada à falta de sinais clínicos patognomônicos, torna fundamental que haja um suporte laboratorial para o diagnóstico. Todas as técnicas parasitológicas, imunológicas e moleculares disponíveis para o diagnóstico são importantes e precisam ser interpretadas de acordo com seus benefícios e limitações (Ribeiro et al., 2018).

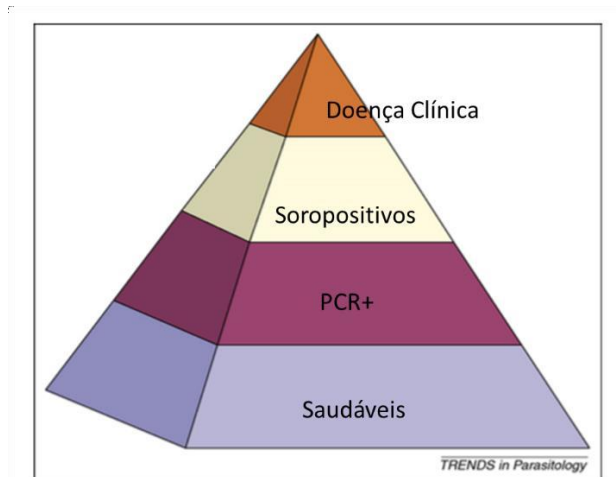
O diagnóstico laboratorial pode ser dividido em forma direta e indireta. A forma direta corresponde à detecção do parasita, que pode ser realizada através da sua visualização nos tecidos por microscopia direta ou pelo isolamento em cultura (testes parasitológicos). Considera-se também forma direta de diagnóstico, quando se observa a evidência da presença do parasito através da detecção específica de parte dele como antígenos (testes imunológicos) ou seu DNA (testes moleculares). Já a forma indireta trata-se dos testes para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (testes sorológicos).

Uma variedade de ensaios sorológicos, parasitológicos e moleculares foi desenvolvida para detecção da infecção canina (Maia e Campino, 2008; Miró et al., 2008). No plano ideal, os ensaios devem ser simples, acessíveis e altamente sensíveis (>95%). Também é desejável alta especificidade, já que existem áreas com sobreposição, tanto de espécies de *Leishmania* como de outros tripanossomatídeos que podem conferir resultados falso positivos para *L. infantum* (Troncarelli et al., 2009; Viol et al., 2012).

O *Canine Leishmaniasis Working Group* (CLWG), propõe classificar em 4 estágios clínicos os cães que apresentaram nos métodos de diagnósticos direto ou indireto, resultados positivos, sendo eles: **A**, cães expostos; **B**, cães infectados; **C**, cães doentes (cães com LVC clinicamente evidente); e **D**, cães gravemente doentes. O estágio A (cães expostos) inclui cães com resultados negativos em diagnóstico citológico, histológico, parasitológico e molecular, mas com baixo título de anticorpos anti-*Leishmania*, esses cães podem ser clinicamente normais ou ter sinais associados a outras doenças. Geralmente, os cães expostos à infecção por *L. infantum* são aqueles que habitam em uma região geográfica em que a presença de vetores de *Leishmania* foi confirmada. Já o estágio B (cães infectados) corresponde a cães em que a presença do parasito foi confirmada de forma direta (por exemplo, resultados positivos em microscopia, cultura ou PCR) e que possuem anticorpos anti-*Leishmania* em baixo título. Esses cães podem ser saudáveis ou ter sinais clínicos associados a outras doenças. O estágio C (cães doentes) refere-se a cães com evidência clínica de Leishmaniose. Esta categoria é composta por cães com resultados citológicos positivos, independentemente dos testes sorológicos, e cães com elevados títulos de anticorpos anti-*Leishmania*. Um ou mais sinais clínicos comuns à Leishmaniose estão presentes. Na ausência de sinais detectáveis no exame físico, tal cão ainda deve ser considerado doente quando tem alterações hematológicas, bioquímicas e urinárias sugestivas de Leishmaniose. Por fim, o estágio D (cães gravemente doentes) são cães com uma condição clínica grave indicada por pelo menos uma dessas situações: evidência de proteinúria, nefropatia ou insuficiência renal crônica; problemas concomitantes, como doenças oculares, causando perda funcional ou doenças articulares graves que prejudicam a mobilidade, podendo essas patologias estarem relacionados ou não à Leishmaniose, mas que por sua natureza requerem tratamento imunossupressor; e por fim, a presença de condições concomitantes incluindo: coinfeções, doenças neoplásicas, endócrinas ou metabólicas e falta de resposta clínica mediante o tratamento com drogas anti-*Leishmania*, quando esse estiver disponível (Paltrinieri et al., 2010).

Em áreas endêmicas, a doença é apenas a ponta do *iceberg*, e a maioria da população é exposta e infectada sem apresentar evidência clínica de doença ou anticorpos séricos anti-*Leishmania*. A **Figura 1.13** corresponde a uma representação esquemática da distribuição da Leishmaniose entre a população canina em um foco endêmico, como visto em um estudo transversal. O pico da pirâmide (laranja) consiste em um subconjunto relativamente pequeno de cães mostrando sinais clínicos da doença. Cães soropositivos sem sinais de doença representam um segundo subconjunto (bege). A maioria dos cães com doença clínica e os soropositivos assintomáticos seriam positivos na PCR. Um terceiro subconjunto inclui cães

PCRs positivos, mas ainda soronegativos e assintomáticos, embora infectados (roxo), e um quarto subconjunto inclui cães que são soronegativos e não abrigam parasitas (azul). Uma minoria de cães pode ser soropositiva e PCR negativo (não mostrada neste modelo). Um estudo da Ilha de Maiorca, Espanha (Solano-Gallego et al., 2001), mostrou que 13% dos cães tinham doença clínica, 26% eram soropositivos, 63% eram positivos para PCR e 67% tinham evidência de infecção por sorologia ou por PCR. (**Figura 1.13**) (Baneth et al., 2008).



**Figura 1.13.** Representação esquemática da distribuição da Leishmaniose Visceral entre a população canina em um foco endêmico. (Adaptado de Baneth et al., 2008.)

#### 1.3.4.1. Diagnóstico Direto

O diagnóstico parasitológico é o único método definitivo, que é baseado em observações de amastigotas por exame microscópico, em cortes histológicos ou esfregaços de aspirado de órgãos linfóides, como medula óssea, linfonodos e baço, bem como no fígado e na pele. Outros métodos clássicos incluem a inoculação em hamsters e a cultura *in vitro* de fragmentos de tecidos para o isolamento da forma promastigota (Grimaldi e Tesh, 1993).

Avaliação citológica permite detecção microscópica de amastigotas em macrófagos em tecidos afetados. Em esfregaços, as células fortemente infectadas podem se romper, de modo que os parasitas possam ser encontrados extracelularmente (Paltrinieri et al., 2010). As amostras para exames citológicos podem ser obtidas através da aspiração por agulha fina dos seguintes tecidos ou lesões: lesões cutâneas papulares, nodulares e ulcerativas (lesões ulcerativas também podem ser avaliadas por meio de *imprint*); medula óssea; linfonodos e quaisquer fluidos biológicos que possam ser obtidos de locais afetados (por exemplo, líquido sinovial quando a artrite ou a poliartrite está presente ou o líquido cefalorraquidiano quando há sinais neurológicos presentes) (Paltrinieri et al., 2010).



As biópsias aspirativas de linfonodos, medula óssea ou baço, podem ser avaliadas por esfregaços corados pelos métodos Giemsa ou Panótico ou colocados em meios de cultura (NNN, LIT e  $\alpha$ -MEM, entre outros). Nos esfregaços de aspirados corados com Giemsa, as amastigotas são visualizadas com o citoplasma em azul pálido e com um núcleo relativamente grande corado em rosa. Paralelamente ao núcleo visualiza-se o cinetoplasto com coloração violeta profundo. A precisão da análise microscópica é influenciada pela capacidade técnica e pela qualidade do preparo do material, bem como dos reagentes utilizados. Se esta abordagem produz resultados negativos, as secções de tecido podem ser mais examinadas através da utilização de ensaios moleculares (Paltrinieri et al., 2010; Roura et al., 1999; Solano-Gallego et al., 2001).

Na ausência de sinais clínicos que possam ser atribuídos a LVC ou que envolvam um órgão ou tecido em particular, as amostras devem ser obtidas de tecidos nos quais é mais provável detectar parasitas, como baço, medula óssea, linfonodo e anel leucocitário obtido a partir da centrifugação do sangue periférico (Mylonakis et al., 2005; Saridomichelakis et al., 2005). O material coletado para avaliação citológica pode ser armazenado e, na situação de resultados negativos, pode ser encaminhado para testes de diagnóstico molecular (por exemplo, PCR para detecção de DNA de *Leishmania*) (Paltrinieri et al., 2010).

A sensibilidade do esfregaço da medula óssea descrita em pacientes humanos é de cerca de 60-85% e do linfonodo em torno de 30-40% (Sundar e Rai et al., 2002; Ribeiro et al., 2018). De acordo com a literatura, em cães, o aspirado esplênico para isolamento do parasita em cultura é considerado o método de escolha para o diagnóstico parasitológico na LVC. Neste estudo, a sensibilidade das culturas do baço para detecção de *Leishmania* foi de 97,9% enquanto nas culturas de linfonodos foi de 25%. (Ribeiro et al., 2018; Barrouin-Melo et al., 2004). Contudo, a aspiração esplênica pode ter complicações hemorrágicas e requer habilidade técnica, bem como infraestrutura para transfusão de sangue e cirurgia (Sundar e Rai, 2002).

Quando a Leishmaniose é fortemente suspeita, apesar dos resultados negativos do teste citológico, o exame histológico é sempre aconselhável, particularmente quando dermatite ou doença de pele caracterizada por lesões focais estão presentes (Paltrinieri et al., 2010). Na rotina clínica, um fragmento obtido por biópsia de pele permite a preparação de lâminas para técnicas citológicas e histopatológicas/imuno-histoquímicas (Tafari et al., 2001).

Uma variante do teste parasitológico é a imuno-histoquímica. Esta técnica se baseia na detecção do parasito em cortes histológicos a partir de um anticorpo primário que se liga a antígenos de *Leishmania*. Posteriormente a revelação da presença do patógeno se dá por anticorpos secundários marcados com peroxidase, proporcionando maior sensibilidade do que

a histopatologia convencional (Faria e Andrade, 2012). Estudos revelaram que a imuno-histoquímica realizada em biópsia de pele de diferentes regiões anatômicas obteve sensibilidade de 62,1%. (Ferrer et al., 1988). De forma semelhante, utilizando linfonodos poplíteos, essa mesma técnica apresentou sensibilidade de 92,6%; 60% e 73,9% em cães sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos, respectivamente (Moreira et al., 2007). Um outro grupo descreveu a realização da imuno-histoquímica com tecidos em blocos de parafina. A sensibilidade do método foi maior que a da avaliação apenas corando os tecidos com hematoxilina-eosina, especialmente com amostras de pele lesadas, sendo 18 biópsias positivas na imuno-histoquímica para 11 na histopatologia de um total de 34 analisadas. A maior sensibilidade se deve a marcação dos parasitos que são mais facilmente diferenciados do restante do tecido (Bourdoiseau et al., 1997).

Uma técnica semelhante que também pode ser aplicada é a imunofluorescência direta, que difere da imuno-histoquímica por utilizar anticorpos secundários fluorescentes. Um estudo comparou a imunofluorescência direta com a pesquisa direta do parasito em esfregaços de linfonodo corados pelo método de Romanowsky. Dos 60 cães com sinais clínicos da doença que foram avaliados, a pesquisa direta da presença do parasito obteve resultado positivo em 50% (n=30) e duvidoso em 36,7% (n=22). Porém quando os esfregaços de linfonodos foram submetidos a reação de imunofluorescência, a reação foi positiva em 93,3% (n=56), sendo excluído os casos duvidosos (Moreira et al., 2002). No caso da imunofluorescência, a leitura da lâmina é ainda mais simples quando comparado a imuno-histoquímica, podendo ser uma alternativa de diagnóstico.

Em um estudo que incluiu 65 cães positivos para DPP@LVC e ELISA para anticorpos anti-Leishmania, foi realizado imuno-histoquímica, hibridização *in situ* e cultura parasitológica de amostras de pele integra, baço, linfonodo e medula óssea. A hibridização *in situ* em amostras do baço e linfonodo apresentaram as maiores taxas de positividade na detecção de *L. infantum*. As taxas de positividade total foram de 70%, 68,1% e 65,8%, para imuno-histoquímica, hibridização *in situ* cultura parasitológica, respectivamente. Ao combinar técnicas, as taxas de positividade foram de 81,5% no baço, 79,0% nos linfonodos, 59,0% na medula óssea e 52,3% na pele. A porcentagem mais alta de cães infectados (87,7%) foi detectada usando amostras de linfonodos. Ao examinar apenas a pele, a positividade foi significativamente maior em cães doentes do que em cães clinicamente saudáveis. Assim, as amostras de baço e linfonodo foram os tecidos mais adequados para confirmar a infecção por *L. infantum* em cães soropositivos. O teste da pele apenas em cães clinicamente saudáveis resultou em uma alta porcentagem de resultados falso-negativos (Furtado et al., 2015).

O cultivo do parasita em meio de cultura a partir de amostras clínicas é indispensável para o isolamento e posterior identificação da espécie. No entanto, nem sempre é possível estabelecer essa a rotina devido ao custo, ao tempo e à infraestrutura necessária. O material clínico, seja biópsia ou aspirado, é inoculado em meio de cultura bifásico Novy-McNeil-Nicolle com Schneider suplementado com antibióticos e incubado em estufa de 24°C a 26°C. O isolamento e a visualização das formas promastigotas pode demorar até um mês (Sundar e Rai, 2002). A grande vantagem desta técnica é que após o isolamento e cultivo de uma grande quantidade de promastigotas, pode ser feito o diagnóstico etiológico analisando o padrão de isoenzimas por eletroforese (Kreutzer et al., 1993; Cupolillo et al., 1994).

Uma outra abordagem para a detecção da infecção por *Leishmania* em cães são as técnicas moleculares, que consistem na detecção do DNA do parasito nas amostras coletadas. As técnicas moleculares têm alta sensibilidade e especificidade. A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa (qPCR) são atualmente parte da rotina de diagnóstico veterinário, sendo particularmente úteis para o acompanhamento do animal durante o tratamento, podendo ser realizadas em várias amostras biológicas, como sangue periférico, aspirado de medula óssea ou linfonodos, fragmento de pele e outros (Silva et al., 2017; Solano-Gallego et al., 2011, 2007). É importante destacar que as informações fornecidas pela PCR/qPCR não devem ser analisadas separadas dos dados clinicopatológicos e avaliações sorológicas (Solano-Gallego et al., 2011).

O diagnóstico baseado em PCR é mais sensível do que os métodos sorológicos. A sensibilidade analítica dos testes moleculares descritos possuem capacidade de detecção de 0,001 e 0,1 parasita/reacção, mas a necessidade de equipamentos de maior custo, infra-estrutura e treinamento de pessoal são os principais obstáculos que impedem a sua aplicação em áreas endêmicas, permanecendo restrito a clínicas/hospitais veterinários e centros de pesquisa (Mohammadiha et al., 2013; Quinnell et al., 2013; Travi et al., 2018).

Os minicírculos de DNA contidos no DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* são os alvos para a maioria dos testes moleculares destinados à detecção de espécies de *Leishmania*. Outros alvos também utilizados são: o *Internal Transcribed Spacer-1* (ITS-1), 18S rRNA (ssrRNA) e glicoproteína-63 (gp-63) (Guerbouj et al., 2014; Pita-Pereira et al., 2012; Rodgers et al., 1990). A especificidade dos testes moleculares é regularmente de 95% a 100% (Travi et al., 2018). A maioria dos relatos mostrou que a PCR convencional baseada em kDNA tem uma sensibilidade de 89% a 100% em amostras de sangue de cães polissintomáticos (Carson et al., 2010; Travi et al., 2018).

A PCR tendo como alvo o kDNA é bastante utilizada em função da sua alta sensibilidade. Uma desvantagem para sua utilização é a padronização, pois está sujeita a problemas técnicos, inclusive resultados falso-positivos. O kDNA possui cerca de 10.000 cópias de minicírculos de DNA por célula, com tamanhos que variam entre 600 e 800 pb. Cada minicírculo é dividido em uma região conservada de aproximadamente 150pb e uma região variável de 600pb (Morales et al., 2001). Oligonucleotídeos, podem ser desenvolvidos para anelar e amplificar em regiões conservadas, identificando assim o gênero (Degraeve et al., 1994), sendo úteis no diagnóstico da infecção por *Leishmania* sp. Quando os iniciadores são direcionados para regiões variáveis do genoma, é possível a discriminação entre as espécies (Eresh et al., 1994; Cortes et al., 2004). Na LVC, a sensibilidade do teste é maior em cães doentes e, além disso, varia durante o curso da infecção, sendo maior (78%-88%) até 135 dias após a infecção e declinando a cerca de 50% após 300 dias (Quinnell et al., 2001). Entre os testes moleculares, a PCR pode detectar a infecção antes da soroconversão, mas é importante acompanhar e monitorar a soroconversão durante o curso da infecção (Coura-Vital et al., 2013). A sensibilidade pode variar também de acordo com a amostra utilizada, sendo possível utilizar amostras de sangue (Mohammadiha et al., 2013); aspirado de medula óssea (Cortes et al., 2004); aspirado esplênico e de linfonodo (Solca Mda et al., 2012); pele saudável (Manna et al., 2004) e swab conjuntival (Leite et al., 2010; De Almeida Ferreira et al., 2012).

Um estudo avaliou a positividade da medula óssea de cães poli-, oligo- e assintomáticos através da PCR com iniciadores para kDNA e ITS-1. Utilizando o iniciador para kDNA, foi detectado o DNA de *Leishmania* em 96,6% dos animais polissintomáticos, 76,5% dos cães oligossintomáticos e 62,2% dos assintomáticos. Já com iniciadores para ITS-1, obteve-se 89,7%, 52,9% e 41,5% de positividade para cães poli-, oligo- e assintomáticos, respectivamente. Observou-se portanto que a sensibilidade diminuiu quando o método é aplicado a cães oligo- e assintomáticos (Carson et al., 2010; Travi et al., 2018).

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é considerada o método diagnóstico com maior sensibilidade (Carson et al., 2010). Ela tem sido empregada para determinar a carga parasitária da infecção no hospedeiro vertebrado, sendo útil não só para o diagnóstico como também para estudar a dinâmica da infecção.

Testes moleculares diferentes avaliados nas mesmas amostras de cães (n = 67 cães) mostraram que qPCR foi mais sensível (91%) do que o nested-PCR convencional tendo como alvo o kDNA (72%) ou ITS-1 (54%), Teste OligoC (70%) e hibridação por PCR (61%) (Carson et al., 2010). Além disso, avaliações da medula óssea mostraram que a qPCR por

sistema TaqMan detectou 0,2 parasitas/mL, enquanto o PCR convencional resultou positivo apenas quando as amostras continham mais que 30 parasitas / mL (Francino et al., 2006).

A amostra utilizada nos testes moleculares tem uma influência significativa na capacidade de testes para identificar cães infectados. As amostras de medula óssea e linfonodo produzem o maior número de resultados positivos em comparação com outros locais de amostra, independentemente do estado clínico, assim como a pele vem sendo bastante utilizada (Almeida et al., 2013; Lombardo et al., 2012, Manna et al., 2004). Métodos diagnósticos menos invasivos e sensíveis, como o *swab* da conjuntiva e a mucosa oral apresentaram maior carga parasitária que o sangue (Aschar et al., 2016; Leite et al., 2010; Lombardo et al., 2012; Travi et al., 2018).

Visando tornar a aplicação dos testes moleculares passíveis a postos de atendimento, sem a necessidade de grande infraestrutura, surgem novas metodologias. Esses métodos utilizam polimerases capazes de amplificar o DNA em temperaturas constantes, não exigindo equipamentos sofisticados ou um alto nível de conhecimento para executar os testes.

A técnica de *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP; Eiken Chemical Company, Tóquio, Japão) usa uma DNA polimerase com atividade de deslocamento na fita de DNA e quatro primers que reconhecem seis diferentes regiões de DNA, tornando-a altamente específica (Mori e Notomi, 2009). Este método foi previamente avaliado em sangue de pacientes com LV (*L. donovani*) com sensibilidades de 90,7% a 96,4% e especificidades de 98,5% a 100% (Khan et al., 2012; Verma et al., 2013). Na China, a utilização de LAMP em amostras conjuntivais identificou 61% de cães infectados, com resultado semelhante ao PCR convencional (58,6%), sendo significativamente melhor do que a microscopia (10,8%) e a sorologia de cães pelo teste ELISA (40,5%) (Gao et al., 2015). No entanto, estes iniciadores de kDNA concebidos a partir de uma cepa de *L. infantum* isolada na China não amplificaram as estirpes de outros países (Travi et al., 2018).

Outro método isotérmico molecular para o diagnóstico de múltiplos patógenos é baseado na *Recombinase Polymerase Amplification* (RPA; TwistDx, UK). Esta técnica consiste em um teste rápido, de fácil execução, capaz de ser realizada em postos de atendimento. A mistura para RPA contém três proteínas principais: uma recombinase, uma proteína de ligação de DNA de cadeia simples e uma polimerase de deslocamento em fita. Em combinação com iniciadores específicos, permite a amplificação do DNA em temperaturas constantes entre 24°C e 45°C e tempos de incubação de 15 a 60 minutos, dependendo do patógeno a ser detectado (Daher et al., 2016; Travi et al., 2018). Os produtos de amplificação podem ser lidos a olho nu em uma fita de fluxo lateral. Um teste de RPA associado a fita de fluxo lateral (RPA-LF) para

LVC foi recentemente desenvolvido com base em primers e sonda de minicírculos tendo kDNA de *L. infantum* como alvo (Castellanos-Gonzalez et al., 2015; Travi et al., 2018). Este teste qualitativo é realizado a 42°C por 40 minutos e, subsequentemente, lido em uma fita de fluxo lateral (Milenia Hybridetect, TwistDX ou UStar Biotechnologies, Hangzhou, China). Tem uma sensibilidade analítica semelhante à qPCR (*SYBR Green*) e pode detectar 40 parasitas por mL de sangue. O RPA-LF foi capaz de detectar DNA de *L. infantum* em amostras de swab de mucosa oral de cães assintomáticos. Em um teste de triagem de 30 cães sem sinais clínicos de uma área endêmica na Argentina mostrou que 50% dos animais estavam infectados subclínicamente conforme determinado pelo RPA-LF comparado com 13,3% que eram sorologicamente positivos usando o teste recombinante de cinesina-39 (rK39) (Castellanos-Gonzalez et al., 2015; Travi et al., 2018).

#### **1.3.4.2. Diagnóstico Indireto**

A soroconversão para antígenos do parasita pode ocorrer até um mês após uma picada de flebotômíneos infectados (Moreno e Alvar, 2002; Travi et al., 2018). A LVC ativa está geralmente associada a títulos de anticorpos significativos de todas as classes, enquanto os níveis baixos de anticorpos são característicos de infecções subclínicas ou cães expostos, mas não infectados (Saridomichelakis, 2009; Travi et al., 2018).

Por isso, uma variedade de métodos sorológicos tem sido utilizada para identificar cães infectados. As técnicas sorológicas quantitativas, como o teste de imunofluorescência (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) são preferencialmente aplicadas. Entretanto, em função da baixa sensibilidade, é possível que existam cães infectados, mas não reagentes nesses testes sorológicos, representando um risco potencial para seres humanos (Quinnell et al., 2013).

Além disso, é descrito que os métodos sorológicos têm sua sensibilidade diagnóstica associada com o aumento da sintomatologia (Dantas-torres et al., 2012; Quinnell and Courtenay, 2009). Outra limitação se refere a reações cruzadas com parasitas como *Trypanosoma*, espécies causadoras de Leishmaniose Cutânea e outros hemoparasitas (Ferreira et al., 2007; Laurenti et al., 2014; Porrozzi et al., 2007; Viol et al., 2012; Zanette et al., 2014), bem como resultados falso-negativos em casos de anergia ou baixos títulos (reações duvidosas) (Lopes et al., 2017).

O teste de aglutinação direta (DAT) é baseado na aglutinação de promastigotas de *Leishmania* (coradas por Coomassie) por anticorpos anti-*Leishmania* presentes na amostra avaliada. Foi o primeiro teste sorológico desenvolvido para uso em campo. É simples, barato e confiável, com precisão clínica comprovada (Adams et al., 2012; Sousa et al., 2011). Além

disso, pode ser realizado em laboratórios que não necessitam de equipamentos elétricos e tem até dois anos de vida útil, podendo ser aplicado a muitas amostras. Embora tenha uma sensibilidade e especificidade de 91% a 100% e 72% a 100%, respectivamente, a leitura subjetiva dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* leva à discrepância de resultados (Sousa et al., 2011; Travi et al., 2018). O teste rápido de aglutinação (FAST) é uma modificação do DAT baseado em uma única diluição de soro acima do ponto de corte do soro normal. Ele requer tempos de incubação mais curtos e foi otimizado para triagem de grandes populações de cães (Schallig et al., 2002).

O teste de imunofluorescência de anticorpos (IFAT) contra promastigotas de *Leishmania* é um método sorológico qualitativo e quantitativo para o diagnóstico de LVC (Paltrinieri et al., 2016; Travi et al., 2018). O uso do IFAT é restrito a configurações laboratoriais porque requer equipamento especializado e pessoal treinado (Solano-Gallego et al., 2014; Travi et al., 2018). A especificidade e a sensibilidade estão próximas de 100% em animais sintomáticos. Algumas limitações notáveis são a reatividade cruzada com outros patógenos, como os tripanossomos (Paltrinieri et al., 2016; Solano-Gallego et al., 2014; Travi et al., 2018) e a sensibilidade significativamente menor para identificar cães assintomáticos em comparação com ELISA (Mettler et al., 2005; Travi et al., 2018).

O ELISA permite triagem de um grande número de amostras utilizando microplacas revestidas com antígeno e um espectrofotômetro que determina os títulos de anticorpos pela densidade óptica. O potencial para a quantificação absoluta de anticorpos torna o ELISA uma ferramenta poderosa, menos suscetível ao viés do operador. Um de seus pontos fortes é a possibilidade de usar combinações de antígenos múltiplos, aumentando assim a sensibilidade e/ou especificidade do método (Travi et al., 2018).

Recentemente, ensaios imunocromatográficos têm sido empregados como testes laboratoriais de rotina em clínicas veterinárias para a detecção de dezenas de doenças, incluindo LVC. Estes testes são rápidos e fáceis de realizar (cerca de 15 minutos), não requerem pessoal treinado ou treinamento especializado em laboratório para interpretar os resultados, e apresentam índices confiáveis de sensibilidade e especificidade. Para LVC, usualmente proteínas recombinantes do parasita, como rK39, são impregnadas em membranas de nitrocelulose, e amostras de soro são aplicadas na plataforma de teste rápido. O Ministério da Saúde do Brasil estabeleceu oficialmente um imunoenensaio cromatográfico rápido para pesquisa canina com base na plataforma de dupla via (*Dual Path Platform* - DPP) para rastreamento de doenças (Ribeiro et al., 2018).

O DPP® LVC é um dispositivo descartável fabricado por Biomanguinhos (Fiocruz – MS), utilizado para o diagnóstico rápido da Leishmaniose Visceral Canina, sendo a principal ferramenta para a vigilância e controle da LVC. O teste se baseia na detecção de anticorpos específicos contra a proteína recombinante K28, que corresponde a fusão dos antígenos K9, K26 e K39. O DPP (*Dual Path Plataform*) é assim chamado por apresentar um processo bidirecional durante o procedimento, melhorando a performance do teste. O teste consiste na formação de duas bandas, onde na banda teste se encontra imobilizado o antígeno K28 recombinante, na banda controle encontra-se a proteína A em uma direção e o revelador (proteína A associada ao ouro coloidal) em outra direção. Após a adição da amostra de soro (também podem ser utilizados sangue ou plasma) e do tampão fornecido pelo fabricante, estes correm em uma direção, para reagir com os antígenos imobilizados no dispositivo. Após cinco minutos adiciona-se o mesmo tampão na outra janela que irá liberar o sistema revelador. Desta forma, as bandas são formadas. A banda teste positiva indica a existência de anticorpos específicos para o parasito, enquanto a banda controle identifica imunoglobulinas presente no soro, servindo como controle para o funcionamento do teste.

Atualmente, os métodos de diagnóstico sorológico da LVC recomendados pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral para os órgãos de saúde pública no Brasil são o teste rápido imunocromatográfico (DPP®LVC, Biomanguinhos) como triagem e o ELISA como confirmatório, utilizados na rotina e nos inquéritos de cães em municípios onde já houve registro da doença (Ministério da Saúde, 2014). Este protocolo demonstrou uma acurácia de 0,91 para cães sintomáticos e 0,97 para cães assintomáticos (Fraga et al, 2016). Em uma avaliação recente do teste DPP®LVC, ele apresentou 89% de sensibilidade e 70% de especificidade. Quando realizado a análise dos grupos clínicos, foi demonstrado 75% de sensibilidade e 73% de especificidade para cães assintomáticos e 94% de sensibilidade e 56% de especificidade para cães sintomáticos (Figueiredo et al, 2018).

### **1.3.5. Tratamento**

Embora as curas parasitológicas raramente sejam alcançadas, e as recorrências clínicas na LVC ocorram com frequência, é necessário considerar que os protocolos disponíveis podem promover cura clínica, aumentar a expectativa e a qualidade de vida, além de reduzir a carga parasitária e infecciosidade aos vetores. Assim, a decisão de tratar um cão doente é o resultado de uma discussão entre o responsável do cão e o veterinário. Um fator importante analisado é a capacidade e/ou disposição do proprietário em cumprir com o protocolo de tratamento (Gharbi et al., 2015; Ribeiro et al., 2018). Além disso, cabe avaliar a capacidade de resposta do cão à



terapia por meio de um perfil completo de exames, que incluem análise sorológica, hematológica, bioquímica e urinária, a fim de avaliar, principalmente, a medula óssea, o estado renal e hepático. Segundo a literatura, a resposta clínica ao tratamento pode variar de ruim a boa, dependendo de seu estado clínico geral inicial e de sua resposta específica à terapia. Por exemplo, espera-se que os cães com insuficiência renal tenham uma taxa de recuperação mais baixa em comparação com aqueles sem rins comprometidos ou apenas proteinúria leve (Solano-Gallego et al., 2011). Por razões de saúde pública e para prevenir a reinfeção, o uso constante de produtos repelentes é recomendado, tais como produtos *SpotOn* de permetrina e/ou coleiras impregnadas com fumetrina ou deltametrina em cães tratados, e monitoramento veterinário contínuo (Ribeiro et al., 2018).

A Portaria Interministerial Nº 1.426, De 11 de Julho de 2008 do Ministério da Saúde, proíbe o tratamento da Leishmaniose Visceral Canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portanto o tratamento de cães com LVC era proibido até 2016, quando foi publicado em Nota Técnica conjunta, nº 001/2016, os Ministérios da Agricultura Pecuária e Abastecimento e da Saúde (MS) autorizaram o registro do produto Milteforan® (Miltefosina), principal droga utilizada no tratamento da LVC na Europa e que não é utilizada no tratamento da doença humana no Brasil. No entanto, o Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), adverte para as consequências da incorporação da miltefosina como tratamento no Sistema Único de Saúde para a Leishmaniose Tegumentar humana. O princípio ativo é o mesmo do único medicamento autorizado no país para o tratamento da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), e a adoção da substância no tratamento de humanos pode impactar diretamente no registro da droga para uso veterinário (CFMV, 2018). Tanto o MAPA em sua Nota Técnica Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA, quanto o Conselho Federal de Medicina Veterinária ainda se ressalta que o tratamento dos cães não se configura como uma medida de saúde pública para controle da doença e, portanto, trata-se única e exclusivamente de uma escolha do responsável pelo animal, de caráter individual.

A miltefosina é uma alquilfosfocolina leishmanicida usada na dermatologia humana como antimitótico. Ela é usada para tratar Leishmaniose Visceral em cães quando administrada por via oral (2 mg / kg, uma vez ao dia, 28 dias) em associação com uma medicação leishmanioestática (Alopurinol) (Farca et al., 2012; Miro et al., 2009; Travi et al., 2018). Um estudo recente no Brasil (n = 36 cães) avaliou a infectividade de cães doentes após um tratamento clínico preconizado com miltefosina. Três meses após o tratamento, houve redução do escore clínico e uma redução significativa da carga de parasitas na medula óssea, linfonodos

e pele. Esses resultados se correlacionaram com os xenodiagnósticos nos quais 74,2% dos cães não eram infecciosos para flebotomíneos (Nogueira et al., 2019). Outros estudos apontam que o tratamento não reduz a carga parasitária em linfonodos (Andrade et al., 2011), exigindo repetições do tratamento. A realização do qPCR (quantitativo) pode ser um bom indicador de recidiva/reinfecção bem como a avaliação clínica periódica. Ainda, dados da literatura tem mostrado que *L. infantum* desenvolve rapidamente resistência à miltefosina (Choudhury et al., 2008; Mondelaers et al., 2016).

O alopurinol (um análogo de purina) é considerado o principal medicamento de primeira linha para tratamento de longo prazo da LVC, frequentemente utilizado em combinação com a miltefosina para o primeiro mês e depois continuado sozinho (Ribeiro et al., 2018). Embora raramente seja usado para o tratamento da Leishmaniose humana, como o alopurinol é a única droga recomendada pela OMS para o tratamento da LVC, recentemente o primeiro relato de resistência ao alopurinol foi publicado em *L. infantum* isolados de cães, sendo associado a recidiva da doença (Yasur-Landau et al., 2016). Cerca de 12% dos cães tratados com alopurinol desenvolvem cristais urinários de xantina, levando, em alguns casos, a urolitíase xantina (Torres et al., 2011).

Alguns outros medicamentos já tiveram seu uso sugerido contra a LVC, sendo estudados *in vivo* ou *in vitro*, como aminosidina, pentamidina, enrofloxacina e marbofloxacina, mas são necessários mais ensaios clínicos controlados (Farca et al., 2012; Noli e Auxilia, 2005; Travi et al., 2018). Algumas delas podem ser usadas como uma alternativa quando a terapia de primeira linha falha ou a função renal é alterada (Pineda et al., 2017).

Uma nova tendência terapêutica é a combinação de drogas leishmanicidas-leishmanioestáticas com imunomoduladores que visam reduzir a carga parasitária e estabelecer uma resposta imune apropriada (domperidona ou análogo de fosfololeato de magnésio-amônio-agregado de proteínas (P-MAPA) (Gómez-Ochoa et al., 2009; Sabaté et al., 2014; Travi et al., 2018).

A domperidona é um derivado benzimidazol com atividade seletiva antagonista ao receptor de dopamina D2, usado como antiemético, gastro-cinético e estimulante na produção de leite. O estímulo à produção de prolactina atua como imunomodulador ativando macrófagos e possui um efeito tanto preventivo como terapêutico (Gómez-Ochoa et al., 2009) No entanto, a maioria dos cães permanece infectada e pode ter recaídas, tornando-se fontes de infecção para o vetor (Travi et al., 2018).

O tratamento sintomático deve ser implementado para tratar infecções bacterianas, úlceras, ceratoconjuntivite e outros sinais. Os corticóides podem ser prescritos quando

complexos imunes são depositados nas articulações ou nos rins, com a ressalva que podem levar a imunossupressão (Gharbi et al., 2015).

### **1.3.6. Estratégias de Prevenção e Controle**

O controle da LVC é uma tarefa difícil devido ao complexo ciclo de transmissão de *L. infantum*. O plano de controle de Leishmaniose Visceral implementado no Brasil, é baseado em três estratégias: diagnóstico precoce e tratamento de casos humanos; triagem sorológica de cães em áreas endêmicas, seguida de eutanásia dos animais soropositivos; e uso de inseticidas em áreas de focos humanos notificados (Ministério da Saúde, 2014). Os casos suspeitos ou confirmados de leishmaniose visceral canina ou felina precisam ser notificados à Secretaria Municipal de Saúde, conform Resolução SMS nº 3784 de 21 de Agosto de 2018, que dispõe sobre a notificação compulsória dos casos suspeitos ou confirmados de zoonoses em animais no Município do Rio de Janeiro.

Considerando que a picada do inseto vetor é a principal via de transmissão da LVC, as medidas de controle de infecção devem ser primariamente focadas na prevenção do contato com o inseto vetor. Com base no conhecimento atual e considerando as ferramentas disponíveis, o controle ambiental de flebotomíneos imaturos é impraticável, pois os microhabitats de larvas e pupas são extremamente variáveis, incluindo, por exemplo, raízes de árvores, tocas de animais, folhas decompostas e furos em árvores (Maroli et al., 2013).

A aplicação de inseticidas nas paredes e telhados de habitações humanas e em abrigos de animais (por exemplo, currais de galinha e currais) mostraram-se eficazes na redução da população de flebotomíneos (Alexander e Maroli, 2003; Maroli et al., 2010). Os riscos ambientais e à saúde humana relacionados ao emprego de organoclorados e outros grupos químicos (por exemplo, organofosforados e carbamatos) levaram progressivamente à sua substituição por piretróides sintéticos (por exemplo, a-cipermetrina, cipermetrina, deltamônio e l-cialotrina), atualmente utilizados pelas autoridades de saúde pública em diversos países (Otranto e Dantas-Torres, 2013). Além da pulverização, podem ser utilizadas barreiras físicas (telas em janelas e canis), barreiras químicas (repelentes) ou manuseio (evitando a exposição ao crepúsculo, eliminando matéria orgânica na área peridomiciliar) (Ribeiro et al., 2018).

O uso de repelentes em cães, como piretróides sintéticos, tornou-se a ferramenta mais eficaz para a prevenção da infecção por *L. infantum* nestes animais (Lopes et al., 2019). Seu modo de ação consiste em um efeito tóxico e irritante nos flebotomíneos, causando desorientação nos insetos e abandono repentino do hospedeiro, seguido de morte logo após o

pouso do inseto no pelo de um animal tratado. Portanto, o repasto sanguíneo geralmente não ocorre e a infecção é geralmente prevenida (Otranto e Dantas-Torres, 2013). Os produtos contendo piretróides sintéticos (deltametrina, permetrina ou fumetrina) sozinhos ou em combinação com outros inseticidas, que exibem efeito sinérgico sobre os insetos estão disponíveis para prevenir a LVC. O efeito de proteção contra os flebotomíneos após a aplicação do produto pode variar de 2 a 4 semanas em formulações *SpotOn* e 4 a 8 meses em coleiras de PVC impregnadas, devendo serem usados tanto em animais não infectados quanto em cães infectados (Brianti et al., 2014; Davoust et al., 2013; Otranto et al., 2010; Wylie et al., 2014). Um estudo conduzido no Nordeste do Brasil, associou o uso das coleiras impregnadas com deltametrina a 4% a uma redução de 53-59% na incidência de LVC (Kazimoto et al., 2018), enquanto outro relatou eficácia de 57,7% (Lopes et al., 2019). Entretanto, um ponto crítico no uso de coleiras repelentes é a sua elevada taxa de perda (Alves et al., 2018). Em muitos casos, os cães residentes nas áreas endêmicas são semi-domiciliados com permissão para circular livremente na área em torno da residência do seu responsável, facilitando a perda de coleira, por exemplo, porque o próprio cão a retira ou são removidas durante brigas entre os animais.

Prevedendo uma possibilidade de falha dessas medidas, o cão ainda precisa ser capaz de responder ao desafio de infecção causado pelas picadas de flebotomíneos infectados, preferencialmente por uma resposta imune adaptativa previamente desenvolvida por vacinação, ou como última alternativa, por quimioterápicos, que podem ajudar o sistema imunológico a combater a infecção (Ribeiro et al., 2018).

A vacinação contra o LVC é uma ferramenta recente para responsáveis de animais de estimação. Até 2014, duas vacinas estavam disponíveis comercialmente no Brasil. A vacina Leishmune® (Zoetis Indústria de Produtos Veterinários, Brasil), composta pelo complexo de glicoproteínas ligadoras de fucose e manose de *Leishmania donovani* e saponina como adjuvante, o que garante a proteção vacinal de 92% e eficácia de 76% (Da Silva et al., 2000). No entanto, no ano de 2014, a licença para fabricação e comercialização de Leishmune® no Brasil foi suspensa (Lopes et al., 2019; Wylie et al., 2014), tendo em vista o parecer técnico emitido pelo Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis do Ministério da Saúde, que considerou insuficiente os estudos de fase III.

A vacina que se encontra disponível no momento no mercado, foi licenciada em 2008, é uma vacina recombinante denominada Leish-tec® (Hertape Calier Saúde Animal, Brasil), contendo a proteína recombinante A2 de *L. donovani* e saponina como adjuvante (Wylie et al., 2014). A proteína A2 é exclusivamente expressa em amastigotas e é essencial para a sobrevivência da amastigota de *L. donovani* no interior da célula hospedeira, tendo sido

identificada como um fator de virulência desta forma do parasita (Resende et al., 2008). Este antígeno é uma proteína específica do estágio amastigota capaz de induzir uma resposta imune protetora contra a LV canina (Coelho et al., 2003; Zanin et al., 2007).

Um estudo comparativo entre animais vacinados com Leishmune® ou Leish-tec® mostrou que 11 meses após a vacinação não houve diferença significativa na carga parasitária (Fernandes et al., 2014). Um ensaio de campo randomizado realizado com 847 cães de uma área endêmica de Minas Gerais, avaliou a eficácia da Leish-tec®. Foi observada uma redução significativa no número de casos de LVC no grupo que foi vacinado, em comparação com o grupo do placebo. A eficácia foi estimada em 71,4% de acordo com os resultados parasitológicos, porém ao adicionar os resultados de xenodiagnóstico, ela caiu para 58,1%. Entre os animais que apresentaram conversão sorológica anti-proteína A2 (componente da vacina), a eficácia atingiu 80,8%, com redução de 46,6% da capacidade de transmissão para os flebotomíneos nesses animais (Regina-Silva et al., 2016). Um outro grupo de pesquisadores, avaliando a vacina Leish-Tec®, observou que 43% dos animais vacinados desenvolveram a LVC (Grimaldi Jr. et al., 2017). Logo, faltam ainda evidências que confirmem a eficácia desta vacina comercial, ou mesmo evidências que mostram que esta não consegue proteger em condições de campo (Wylie et al., 2014).

Em áreas endêmicas, o método de controle implementado no Brasil é a realização da triagem sorológica dos animais e eutanásia dos cães infectados (Ministério da Saúde, 2014). Entretanto, esta abordagem não obteve sucesso no controle da doença. A análise através de um modelo matemático mostrou que esta falha foi devido à alta incidência e gravidade da infecção na população canina, a baixa sensibilidade do teste diagnóstico, e atrasos no tempo entre o diagnóstico e remoção/eutanásia dos animais infectados (Courtenay et al., 2002). Além disso, para um efetivo controle da LVC, outras medidas deveriam ser associadas como, por exemplo, o uso de coleiras impregnadas com inseticidas, ações educativas, a posse responsável dos animais, e o controle vetorial através do manejo ambiental e limpeza do peridomicílio, evitando assim, a aproximação de animais reservatórios e vetores (Sevá et al., 2016).

A eutanásia como medida de controle da doença é bastante controversa, pois além dos aspectos éticos, não há consenso nos dados disponíveis na literatura. Alguns estudos mostraram uma diminuição da incidência de LV em cães e crianças após triagem sorológica e eutanásia de cães soropositivos (Romero e Boelaert, 2010), enquanto outros chegam a sugerir que essa prática seja abandonada pois não possui evidências científicas (Costa, 2011). Essa estratégia de controle é cada vez mais debatida, principalmente porque a incidência de LV humana permaneceu alta no Brasil apesar da sua aplicação nos últimos anos (Romero e Boelaert, 2010).

As razões para o fracasso da estratégia de eutanásia de cães usada no Brasil têm sido amplamente discutidas nos últimos anos e incluem: (i) outros animais (por exemplo, marsupiais, roedores e os próprios seres humanos) podem atuar como reservatórios de *L. infantum*; (ii) exames de população canina para *L. infantum* podem ser muito imprecisos quando baseados em testes sorológicos, por exemplo, ensaio imunoenzimático (ELISA) e teste de imunofluorescência indireta (IFI); e (iii) a rápida substituição de cães sacrificados por animais jovens aumenta a proporção de animais suscetíveis na população (Courtenay et al., 2002; Dantas-Torres et al., 2012; Otranto e Dantas-Torres, 2013; Quinnell e Courtenay, 2009; Romero e Boelaert, 2010). A ineficácia de tal estratégia é indicada pela tendência crescente no número de casos humanos de LV zoonóticos observados entre os anos de 1990 e 2010, apesar do número incalculável de cães mortos nas últimas décadas (Dantas-Torres et al., 2012; Otranto e Dantas-Torres, 2013).

O futuro do controle da LVC, portanto, deve incluir uma abordagem integrada à prevenção, associando a vacinação contra *L. infantum* e o uso de repelentes tópicos. A vacina impediria o estabelecimento da infecção introduzida pelas picadas dos flebotomíneos que escapam ao efeito inseticida (Miró *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011). Além da conscientização dos proprietários para não abandonar um cão soropositivo ou doente, tratando-o quando possível, caso contrário, realizando eutanásia (Gharbi et al., 2015). A realização de atividades de educação em saúde, visando a participação ativa da comunidade para que busque o atendimento precoce, bem como contribua de forma participativa das medidas de controle da doença (saneamento ambiental, controle vetorial, controle do reservatório, entre outras) também é imprescindível (Ministério da Saúde, 2014).

## 2. **OBJETIVO**

### 2.1. **Objetivo Geral**

Avaliar a aplicabilidade de métodos moleculares e sorológicos rápidos no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina em cães de diferentes escores clínicos e estudar a progressão da carga parasitária e o tempo necessário para cães de baixo escore clínico se tornarem fonte de infecção para os flebotomíneos.

### 2.2. **Objetivos Específicos**

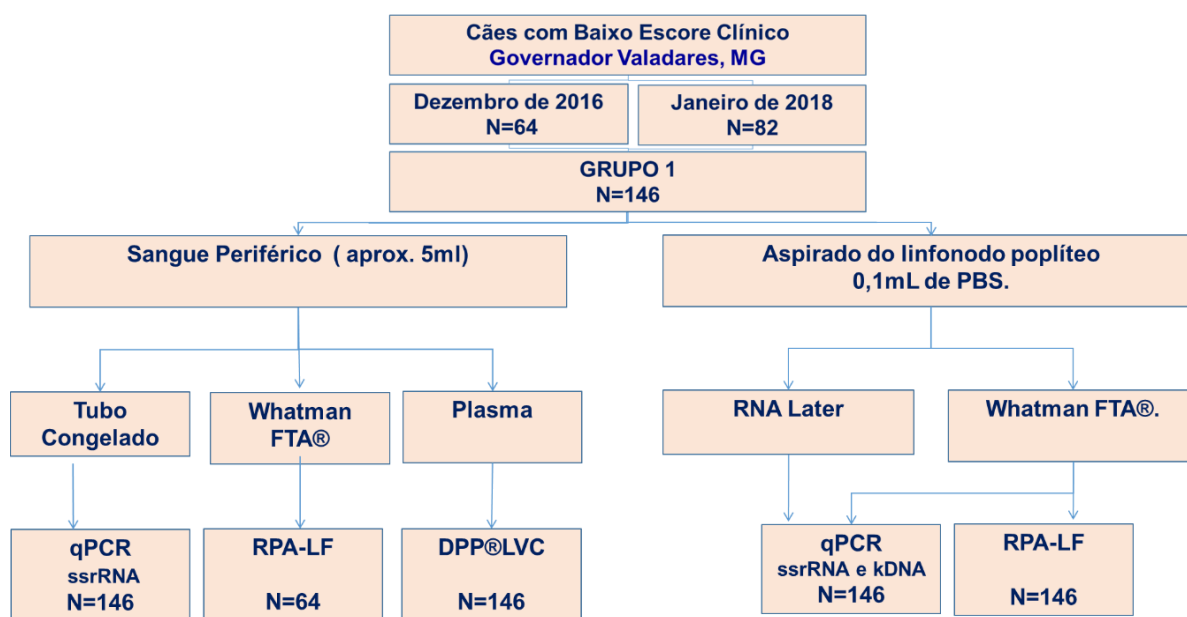
- a. Avaliar a capacidade da RPA-LF identificar cães com baixo escore clínico infectados por *L. infantum* em condições de campo.
- b. Avaliar os resultados do teste DPP®-LVC de forma semiquantitativa através do cálculo do índice de reatividade em cães com diversos escores clínicos.
- c. Relacionar os valores de índice de reatividade com a carga parasitária esplênica e do linfonodo.
- d. Avaliar o RPA-LF como método de diagnóstico alternativo para postos de atendimento.
- e. Avaliar a capacidade de infectar o vetor em cães com baixo escore clínico por meio de xenodiagnóstico.
- f. Realizar o acompanhamento de cães a fim de avaliar a variação do índice de reatividade, progressão da carga parasitária e o tempo necessário para cães positivos para *L. infantum* serem capazes de infectar o vetor.
- g. Elaborar recomendações para o manejo dos cães de áreas endêmicas para Leishmaniose Visceral Canina baseadas no conceito de índice de reatividade, positividade nos testes moleculares e capacidade de infectar o vetor.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Aspectos Éticos

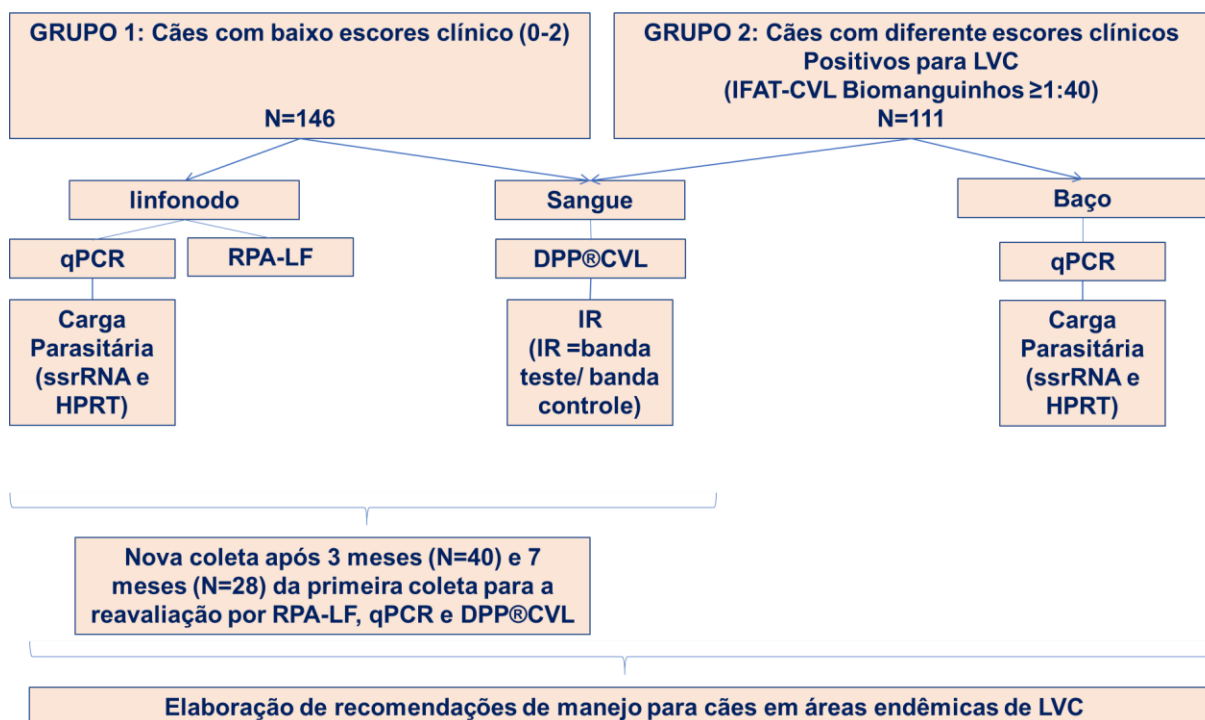
Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética para Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz e aprovado sob a Licença CEUA/IOC L-36/2016 com validade até 31 de agosto de 2020 para coleta de amostras de cães com baixo escore clínico (Grupo 1). O grupo 2 foi formado por cães de diversos escores clínicos, cujas amostras de sangue e baço foram usadas. As amostras do Grupo 2 eram pertencentes a coleção do Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, coletadas entre os anos de 2009 a 2011. As amostras eram oriundas de necropsia, não sendo necessário submissão ao CEUA-IOC, segundo a Lei 11794/08, uma vez que os animais não foram manipulados e as coletas realizadas *post mortem*.

#### 3.2. Desenho do estudo

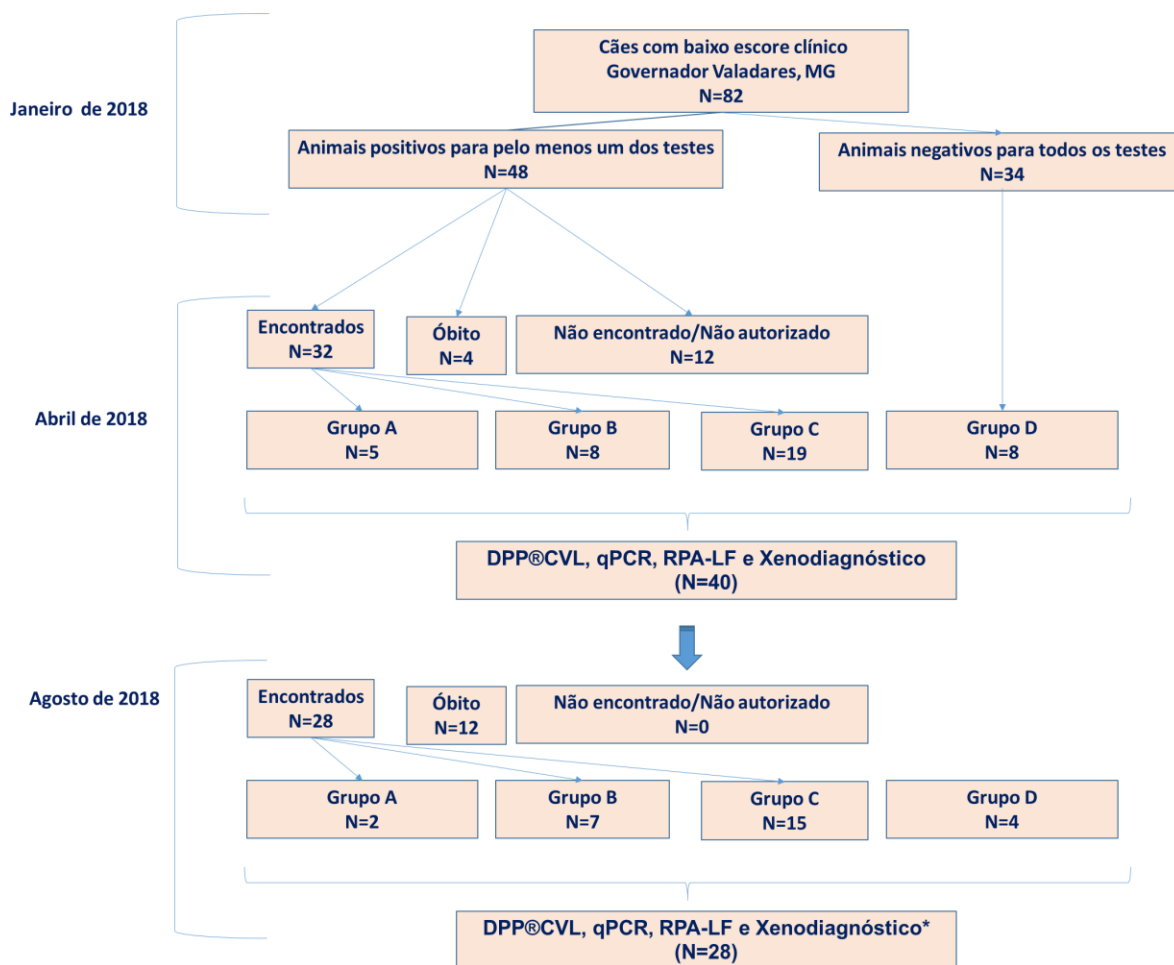


**Figura 3.1.** Desenho experimental para o objetivo: Avaliar a capacidade da RPA-LF identificar cães com baixo escore clínico infectados por *L. infantum* em condições de campo. qPCR: Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa; RPA-LF: *Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow*; DPP®LVC: *Dual Path Platform* para diagnóstico Leishmaniose Visceral Canina; ssrRNA: Subunidade 18S do RNA ribossomal de *Leishmania* sp.; kDNA: Ácido deoxirribonucléico dos minicírculos do cinetoplasto de *Leishmania* sp.





**Figura 3.2.** Desenho experimental para os objetivos: avaliar os resultados do teste DPP@-LVC de forma semiquantitativa através do cálculo do índice de reatividade em cães com diversos escores clínicos; relacionar os valores de índice de reatividade com a carga parasitária esplênica e do linfonodo; avaliar o RPA-LF como método de diagnóstico alternativo para postos de atendimento; elaborar recomendações para o manejo dos cães de áreas endêmicas para Leishmaniose Visceral Canina baseadas no conceito de índice de reatividade, positividade nos testes moleculares e capacidade de infectar o vetor. DPP@LVC: *Dual Path Platform* para diagnóstico Leishmaniose Visceral Canina; IR: Índice de Reatividade; qPCR: Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa; RPA-LF: *Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow*; ssrRNA: Subunidade 18S do RNA ribossomal de *Leishmania* sp.; HPRT: Hipoxantina fosforibosiltransferase.



**Figura 3.3.** Desenho experimental para os objetivos: avaliar a capacidade de infectar o vetor em cães com baixo escore clínico por meio de xenodiagnóstico; realizar o acompanhamento de cães a fim de avaliar a variação do índice de reatividade, progressão da carga parasitária e o tempo necessário para cães positivos para *L. infantum* serem capazes de infectar o vetor; elaborar recomendações para o manejo dos cães de áreas endêmicas para Leishmaniose Visceral Canina baseadas no conceito de índice de reatividade, positividade nos testes moleculares e capacidade de infectar o vetor. Grupo A: cães positivos para todos os testes na análise de janeiro de 2018; Grupo B: cães positivos apenas no DPP®LVCVC na análise de janeiro de 2018; Grupo C: cães que apresentam RPA-LF positivo na análise de janeiro de 2018; Grupo D: cães negativos para todos os testes na análise de janeiro de 2018; DPP®LVC: *Dual Path Platform* para diagnóstico Leishmaniose Visceral Canina; IR: Índice de Reatividade; LVC: Leishmaniose Visceral Canina; qPCR: Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa; RPA-LF: *Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow*.

### 3.3. Caracterização da área de estudo

Este estudo foi realizado no município de Governador Valadares, pertencente ao bioma da Mata Atlântica, localizado no interior de Minas Gerais, na região Sudeste do Brasil. Localiza-se na latitude: 18° 51' 04" S e longitude: 41° 56' 58" W, no Vale do Rio Doce e está situado a cerca de 320 km a leste da capital do estado, Belo Horizonte. Segundo dados de 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, possui área da unidade territorial de 2.342,325 km<sup>2</sup>, com esgotamento sanitário adequado em 92,8 % do território, 77,6 % de arborização de vias públicas e 44,2% de urbanização de vias públicas. Possui população de 263.689 pessoas no último censo realizado em 2010, com densidade demográfica de 112,58 hab/km<sup>2</sup>. A população estimada em 2019 foi de 279.885 pessoas que se encontram distribuídas em mais de 100 bairros da região urbana e em mais de 10 distritos sitiados na zona rural. O salário médio mensal dos trabalhadores formais em 2017 foi estimado em 2,0 salários mínimos (IBGE, 2019).

Segundo o Centro de Controle de Zoonoses, o município de Governador Valadares possui uma população canina de aproximadamente 20.000 cães na zona urbana, de acordo com as três últimas campanhas de vacinação antirrábica realizadas até 2017 (Leal, 2017). Dados disponíveis no site da Prefeitura Municipal relatam que em 2014, cerca de 12 mil amostras de sangue de cão foram testadas, sendo 2.637 cães positivos e submetidos à eutanásia. Em humanos, em 2015, foram 78 testes, com 17 indivíduos positivos.

Em acordo com os responsáveis pelo Centro de Controle de Zoonoses do município de Governador Valadares, Minas Gerais, foi permitido a realização do estudo em dois bairros por eles selecionados, apresentaram elevadas prevalências de LVC. Foram, portando, avaliados cães oriundos dos bairros Vila Isa (18o53'07"S, 41o56'46"W) (N=64) e Santa Helena (18o50'23"S, 41o56'44"W) (N=82), localizados na área urbana do município de Governador Valadares, MG (**Figura 3.4; Figura 3.5**).

Dados da literatura revelam que a no bairro de Vila Isa, no período de 2008 a 2011 em um total de 230 cães testados por IFAT, 68 foram positivos (29,5%), além de um caso de Leishmaniose Visceral Humana. Enquanto, em Santa Helena a prevalência em cães foi de 37,8% com 7 casos humanos (Barata et al., 2013). Em um estudo conduzido em todo o município, com 5851 cães, 2054 (35,1%) foram DPP®LVC positivo. Nesse estudo também foi observado que 33,2% (n=3835) das pessoas já tiveram cão com LVC na residência (Leal, 2017). Segundo Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação, no ano de 2017, houve 28 casos de Leishmaniose Visceral com 12 óbitos registrados. Em função da endemicidade e elevada prevalência na região, o município de Governador Valadares se

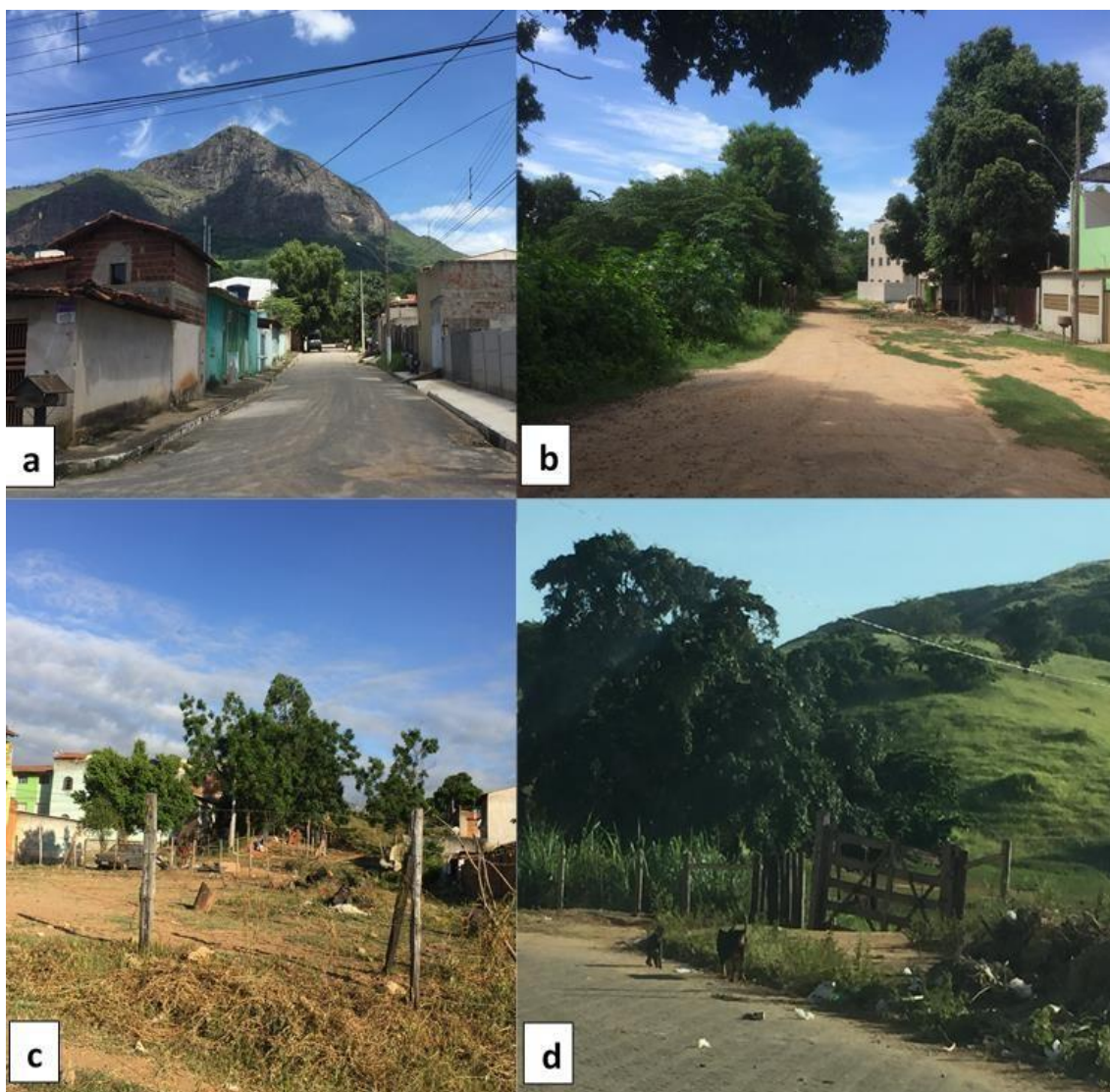
mostrou um local apropriado para o tipo de estudo que foi realizando por possuir uma alta incidência da LVC.



**Figura 3.4.** Localização do município de Governador Valadares no Brasil e no estado de Minas Gerais (esquerda). Localização dos bairros de Vila Isa e Santa Helena (direita).

Disponível em <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1107863> (esquerda).

Disponível em Google Maps (direita). Acesso em 10 de março de 2019.



**Figura 3.5.** (a), (b) Vila Isa, Governador Valadares, MG, Brasil. (c), (d) Santa Helena, Governador Valadares, MG, Brasil. Imagens do arquivo pessoal.

### 3.4. Animais e Avaliação Clínica

As residências de ambos os bairros (Vila Isa e Santa Helena) foram visitadas. Os animais foram avaliados clinicamente por um médico veterinário, quanto a presença de sinais clínicos de LVC (dermatite, onicogribose, conjuntivite/uveíte, condição corporal, alopecia e linfadenopatia). Todos os animais foram avaliados pelo mesmo profissional evitando assim a variação entre observadores. Para a formação do Grupo 1, os seguintes critérios de inclusão foram utilizados para seleção dos animais: autorização do responsável do cão através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, cães com mais de três meses de idade e apresentando no máximo um sinal clínico leve de LVC. Uma vez atendidos os critérios de inclusão, foi solicitado que o responsável pelo animal assinasse um termo de consentimento livre e esclarecido para inclusão no estudo. Não foi realizado nenhum teste diagnóstico de pré-triagem para a formação do Grupo 1.

Cada animal foi identificado por um número e preenchido uma ficha cadastral contendo nome, raça, idade, peso/porte, comprimento do pelo, sinais clínicos (**Anexo I**). A avaliação clínica desses animais foi realizada através do estabelecimento de um escore clínico, a partir da escala de Quinnell e colaboradores adaptada (Quinnell, Courtenay, Shaw, et al., 2001, Cavalcanti et. al., 2015). Os sinais clínicos avaliados foram: dermatite, onicogribose, conjuntivite/uveíte, condição corporal, alopecia e linfadenopatia, sendo em seguida, quantificados de acordo com a intensidade, recebendo 0 quando ausente, 1 quando leve, 2 quando moderado e 3 quando intenso. O escore clínico final corresponde a soma dos valores obtidos em cada sinal clínico, classificando os cães em apresentando baixo (0-2), médio (3-6) e elevado (7-18) escore clínico. Aplicando essa classificação de sinais clínicos, todos os animais do Grupo 1 apresentavam baixo escore clínico (0 ou 1).

Para avaliação do DPP®LVC como método semiquantitativo (Objetivo Específico b), dois grupos de animais foram utilizados, o Grupo 1 (descrito acima) e o Grupo 2, formado por animais com variados escores clínicos. Esse Grupo 2 foi constituído por amostras de 111 cães de diferentes raças ou sem raça definida, que foram positivas (título  $\geq$  1:40) no teste sorológico de Imunofluorescência indireta para Leishmaniose Visceral Canina (IFAT-LVC Biomanguinhos), o qual era recomendado pelo programa de controle da LVC no período de coleta (2009 a 2011). Tanto diagnóstico como eutanásia foram realizadas pelas equipes dos Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) dos municípios de Rondonópolis, Barra do Garça, Várzea Grande e Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. A avaliação clínica desses animais foi realizada como descrito para os cães provenientes de Governador Valadares, MG. As amostras

formadoras do Grupo 2, pertenciam ao banco de amostras do Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose e foram caracterizadas previamente por Cavalcanti *et al.*, 2015. Os cães pertencentes ao Grupo 2 foram subdivididos de acordo com o escore clínico: baixo (N=39), médio (N=36) e elevado (N=36).

A inclusão do Grupo 2 foi realizada para avaliação do DPP®LVC como método semiquantitativo, primeiramente em um grupo amostral mais variado e com amostras mais invasivas, para posteriormente checarmos sua aplicabilidade em uma área endêmica (Grupo 1), em um grupo amostral formado somente por animais com escore clínico baixo e utilizando amostras menos invasivas.

### 3.5. Coleta e armazenamento das Amostras

Em um primeiro momento, foi realizada a contenção física do animal por meio de imobilização manual em posição quadrupedal, sendo colocado, quando necessário, focinheira de pano acolchoada adequada ao porte do animal e acomodada de forma que não causasse dificuldade respiratória. Uma solução de álcool a 70% foi utilizada para antissepsia do local de coleta de sangue. Foi então coletado sangue periférico por punção da veia jugular, com auxílio de garrote manual, utilizando seringa e agulha 21G, posteriormente armazenado em tubo estéril contendo EDTA. Em alguns casos, quando o animal era mais agitado, foi utilizado a veia cefálica, por meio de seringa e *scalp* 23G (**Figura 3.6 a**). O volume coletado foi de 10mL, respeitando o volume máximo referente a 1% do peso do animal. A hemostasia foi realizada por pressão do local da coleta com gaze estéril. Um total de 0,1mL foi adsorvido em papel Whatman FTA®, seco em temperatura ambiente e armazenado em envelope contendo sachês de sílica gel, para posterior análise. Já 0,2mL foi aliquoteado em microtubo de 1,5mL e congelado. O restante do sangue total foi centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm para separação do plasma, o qual também foi aliquoteado em microtubo de 1,5mL e congelado a -20°C.

Em seguida, foi coletado aspirado de linfonodo poplíteo utilizando agulha fina 26G, acoplada a seringa de 1ml contendo 0,2 mL de PBS estéril. A região do linfonodo foi puncionada em sentidos diferentes exercendo a pressão negativa através da aspiração (**Figura 3.6b**). Em seguida, o material aspirado foi homogeneizado no PBS estéril presente na seringa. Um volume de 0,05mL foi transferido para um microtubo de 1,5mL contendo solução de RNA Later® (Ambion, Applied Biosystems, Life Technologies Corporation), outros 0,05mL foram transferidos para um outro microtubo de 1,5mL contendo 500µL de etanol a 95% (amostra

reserva). O mesmo volume foi adsorvido em dois círculos no papel Whatman FTA® e seco em temperatura ambiente. Ambos os microtubos foram congelados a -20°C.



**Figure 3.6** (a) Animal contido fisicamente para coleta de amostra de sangue periférico em veia cefálica. (b) Localização de linfonodo poplíteo por meio de palpação para posterior coleta de material. Imagens do arquivo pessoal.

Para avaliação do DPP®LVC como método semiquantitativo (Objetivo Específico b), também foram utilizadas um total de 111 amostras de soro e de baço congelados, obtidas por meio de necropsia realizadas de 2009 a 2011, que já estavam armazenadas na coleção do Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose.

### 3.6. Acompanhamento dos animais residentes na área endêmica

Visando avaliar a dinâmica de transmissão de LVC no bairro estudado, oito animais negativos para todos os testes realizados, que residiam junto com animais positivos ou na rua com maior número de cães positivos foram selecionados para uma segunda análise. Totalizando 40 animais para acompanhamento, sendo 32 positivos para pelo menos um dos testes e oito negativos para todos os testes na primeira análise (janeiro de 2018). Nestes animais foram repetidos o DPP®LVC, RPA-LF com DNA obtido a partir de amostras de aspirado de linfonodo conservadas no papel de filtro e avaliado a carga parasitária por meio da qPCR com iniciador para o *ssrRNA* com DNA obtido a partir de amostras de aspirado de linfonodo armazenado em RNA Later®, além do xenodiagnóstico. Nesta segunda visita (abril de 2018), todos os cães receberam as coleiras impregnadas com deltametrina a 4%. De acordo com a positividade para cada teste na primeira visita (janeiro de 2018), quatro grupos foram formados com animais positivos para pelo menos um dos testes e um quarto grupo com os animais negativos .



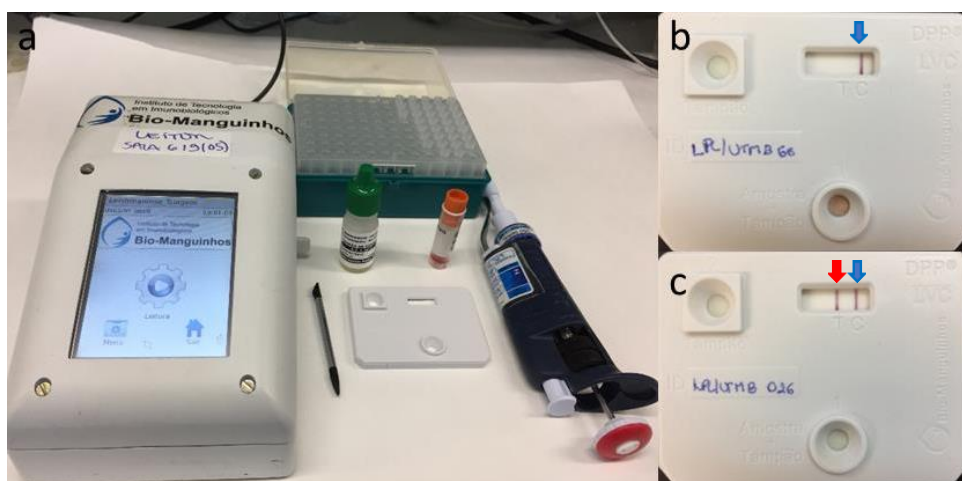
O número de animais acompanhados em cada grupo (A: 5 animais ,B: 8 animais , C: 19 animais e D: 8 animais) não foi o mesmo, em função da dificuldade de obtenção dos animais, uma vez que se trata de um estudo avaliando a infecção natural, onde os animais foram mantidos em posse dos responsáveis, o que leva a uma grande perda no número de animais. Além disso, a maior parte dos cães eram semi-domiciliados, ou seja, não passavam todo o tempo sob os cuidados dos responsáveis, o que possibilita óbitos por causas não esclarecidas.

Uma terceira visita foi realizada a esses animais em agosto de 2018, visando reavaliar os resultados dos testes. Na terceira visita, apenas 28/40 animais foram encontrados, sendo que para dois deles, o responsável do animal não autorizou a realização de um novo xenodiagnóstico. Uma nova coleira repelente foi entregue nesta visita.

### **3.7. Teste Sorológico (DPP®LVC)**

O diagnóstico sorológico dos 257 animais do estudo (Grupo1: 146 cães e Grupo 2: 111 cães) foi realizado pelo teste imunocromatográfico rápido DPP®LVC (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. No estudo, foram utilizados 5µL de plasma ou soro, que foram adicionados ao compartimento de amostra, juntamente com duas gotas de tampão de corrida fornecido pelo fabricante. Após aguardar cinco minutos, quatro gotas do mesmo tampão de corrida foram adicionadas ao compartimento do tampão. Os resultados foram avaliados após 15 minutos. Há possibilidade de leitura visual, onde observação de apenas uma linha no local “C” (controle) corresponde a um resultado negativo e a observação de duas linhas, uma no local “C” e outra no local “T” (teste) que equivalem a um resultado positivo.

No entanto, para o estudo foi utilizado um leitor ótico desenvolvido por Biomanguinhos (**Figura 3.7**) capaz de quantificar a intensidade das bandas teste e controle. Para o leitor, são consideradas negativas as amostras de animais que apresentam ausência da banda teste ou a mesma com uma intensidade inferior ao valor de corte determinado pelo fabricante do leitor. As amostras consideradas positivas apresentam banda teste com intensidade superior ao valor de corte estabelecido pelo leitor. Em função dessa capacidade do leitor atribuir valores as bandas teste e controle, foi possível calcular o índice de reatividade (IR), que consiste na razão da intensidade da banda teste e banda controle ( $IR = \text{banda teste} / \text{banda controle}$ ). A intensidade da banda teste corresponde aos anticorpos específicos anti-*Leishmania*, enquanto a intensidade da banda controle reflete os anticorpos não específicos presentes no soro.



**Figura 3.7.** a) Material utilizado no diagnóstico sorológico. Na imagem é possível observar o leitor desenvolvido por Biomanguinhos, ponteiros estéreis, DPP®LVC, tampão de amostra, tubo contendo soro de animal a ser testado e pipeta de 10 $\mu$ L. b) Exemplo de teste DPP®LVC negativo. c) Exemplo de teste DPP®LVC positivo. Seta azul: banda controle; Seta vermelha: banda teste.

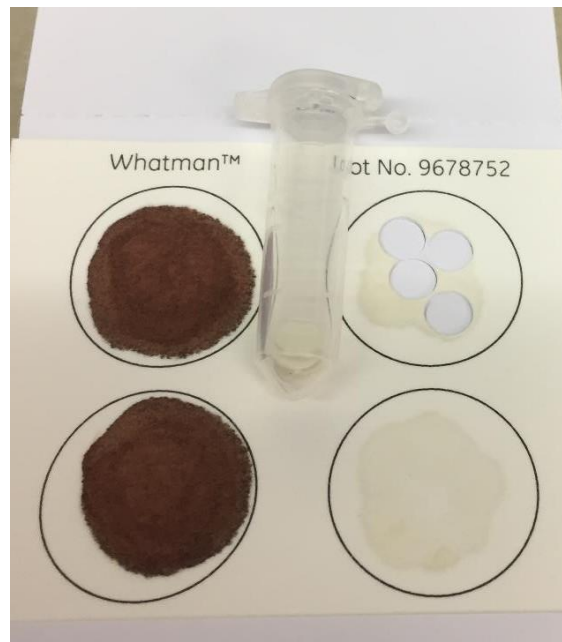
### 3.8. Diagnóstico Molecular

#### 3.8.1. Extração de DNA

O material obtido a partir do aspirado de linfonodo acondicionado em RNA Later® (Ambion, Applied Biosystems, Life Technologies Corporation) teve seu DNA extraído pelo o *kit* de extração Wizard® Genomic DNA Purification System (Promega), segundo orientações do fabricante para extração de cultura de células teciduais. Sendo o DNA eluído em 30 $\mu$ L ao fim da extração.

O sangue total teve seu DNA extraído pelo *kit* de extração DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN) de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA foi eluído em 100 $\mu$ L ao fim da extração.

Visando a padronização da extração de DNA do material coletado em papel Whatman FTA®, dois ou quatro discos cortados com auxílio com *punch* para biópsia de 6mm de diâmetro foram obtidos de um grupo de amostras (n=6). Os discos foram colocados em microtubos e foram realizadas três lavagens com 500 $\mu$ L de tampão FTA (Whatman, GE Healthcare Life Sciences), seguido de duas lavagens com tampão TE pH 8 (Sigma). Em seguida os discos foram fervidos em 150  $\mu$ L de tampão TE durante 30 minutos em banho seco a 95°C para eluição do DNA (Saldarriaga et al., 2016) (**Figura 3.8**). O



**Figura 3.8.** Papel Whatman FTA® contendo sangue total e aspirado de linfonodo. No canto superior direito é possível observar os quatro círculos de 6mm de diâmetro cortados para extração. No centro, um microtubo contendo os círculos cortados.

### 3.8.2. PCR em tempo real com iniciadores para kDNA

O DNA extraído de aspirado de linfonodo a partir do papel Whatman FTA® foi utilizado para avaliação qualitativa das amostras com iniciadores para kDNA de *Leishmania* sp. (Pita-Pereira et al., 2012). O gene constitutivo para subunidade 18S de mamíferos foi utilizado para avaliar a qualidade/presença de DNA de cão nas amostras (Loria-Cervera et al., 2016) (**Tabela 3.1**).

**Tabela 3.1.** Genes alvos e desenho dos iniciadores utilizados para PCR em tempo real para kDNA.

Gene Alvo		Sequência 5´-3´	Tamanho (pb)
kDNA <sup>1</sup>	S	GGCCCACTATATTACACCAACCCC	120
	AS	GGGGTAGGGGCGTTCTGC GAA	
18S <sup>2</sup>	S	ACCGCAGCTAGGAATAATGGA	157
	AS	GCCTCAGTTCGAAAACCA	

S, senso; AS, antisenso; pb, pares de base

<sup>1</sup>Pita-Pereira et al., 2012. <sup>2</sup>Loria-Cervera et al., 2016.

As reações foram realizadas em placas de 384 poços, onde 2,5 µL de DNA total extraído foi adicionado a um volume final de 10,0 µL contendo 5,0 µL Power SYBR Green Master Mix 1X (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc.), 1 µL de cada iniciador para kDNA (5µM) ou 1µL para 18S (5µM) e água livre de nucleases. As reações foram realizadas no equipamento ViiA7® (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc.) com temperatura de ativação de 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos a 95°C / 15 segundos e 60°C / 1 minuto. Uma curva de dissociação (95°C / 15 segundos, 60°C / 1 minuto e 95°C / 15 segundos) foi realizada para avaliação de amplificação inespecífica. Todas as reações foram feitas em duplicata para cada alvo e ambos os alvos foram executados em poços diferentes na mesma placa para a mesma amostra. Controles negativos (DNA de cães de áreas não endêmicas), controles positivos (DNA extraído de cultura de *L. infantum*) e a água utilizada na reação foram incluídos. Os resultados foram considerados positivos quando apresentaram *Cycle Threshold* (CT) menores que os dos controles negativos, sendo avaliados de forma qualitativa apenas (presença e ausência de DNA de *Leishmania* ).

### 3.8.3. PCR em tempo real com iniciadores para ssrRNA

O DNA extraído a partir do fragmento de baço congelado (Grupo 2) e aspirado de linfonodo armazenado em RNA Later® (Grupo 1) armazenado em RNA Later® (Ambion, Applied Biosystems, Life Technologies Corporation) foram utilizados tanto para determinação dos animais positivos como para estimar a carga parasitária, segundo protocolo descrito previamente por Cavalcanti e colaboradores (Cavalcanti et al., 2015).

Iniciadores direcionados para a amplificação da subunidade 18S do RNA ribossomal de *Leishmania* sp. (ssrRNA) (Prina et al., 2007) e o gene constitutivo de cão hipoxantina fosforibosiltransferase (HPRT) (Cavalcanti et al., 2015) foram utilizados para determinar a carga parasitária e para normalizar o número de células na amostra, respectivamente (**Tabela 3.2**). Curvas padrão com diluição seriada do DNA de promastigotas de *Leishmania* e de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de cão foram construídas. As contagens de PBMC de cães não infectados e das promastigotas de *L. infantum* IOC/L3033 (MCAN/BR/2007/CG-1) foram determinadas utilizando-se um contador de células (Coulter Z1™®, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA). O DNA total foi extraído a partir de  $1,0 \times 10^6$  células PBMC e de  $1,0 \times 10^7$  promastigotas. As curvas foram preparadas usando diluições seriadas de 10 vezes do DNA total purificado a partir de  $1,0 \times 10^{-2}$  a  $1,0 \times 10^7$ .

**Tabela 3.2.** Genes alvos e desenho dos iniciadores utilizados para PCR em tempo real para *ssrRNA*.

Gene Alvo		Sequência 5'-3'	Tamanho (pb)
<i>ssrRNA</i> <sup>1</sup>	S	TACTGGGGCGTCAGAG	153
	AS	GGGTGTCATCGTTTGC	
HPRT <sup>2</sup>	S	AAAACAATGCAGACTTTGCT	58
	AS	CCTTGACCATCTTTGGATTA	

S, senso; AS, antisenso; pb, pares de base

<sup>1</sup>Prina, et al., 2007. <sup>2</sup>Cavalcanti et al., 2015.

Os ensaios foram padronizados e as curvas padrão para a quantificação foram definidas com coeficientes de variação (R2) de 0,966 e 0,943, respectivamente. A curva padrão para o gene HPRT compreendeu seis pontos de diluição seriada e para o gene *ssrRNA* oito pontos. As temperaturas da curva de dissociação foram 74,0°C e 79,0°C para os genes HPRT e *ssrRNA*, respectivamente (Cavalcanti et al., 2015).

As reações foram realizadas em placas de 96 poços, onde 2 µL de DNA total extraído foi adicionado a um volume final de 20,0 µL contendo 10,0 µL Power SYBR Green Master Mix 1X (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc.), 0,6 µL de cada iniciador para HPRT (10µM) ou 1µL para *ssrRNA* (10µM) e água livre de nucleases. As reações foram realizadas no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR® (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc.) com temperatura de ativação de 95°C por 10 minuto, seguida por 40 ciclos a 95°C / 15 segundos e 60°C / 1 minuto. Uma curva de dissociação (95°C / 15 segundos, 60°C / 1 minuto e 95°C / 15 segundos) foi realizada para avaliação de amplificação inespecífica. Todas as reações foram feitas em duplicata para cada alvo e ambos os alvos foram executados em poços diferentes na mesma placa para a mesma amostra. Controles negativos, controles positivos (incluindo pontos da curva-padrão) e a água utilizada na reação foram incluídos. Foram considerados positivos, as amostras que apresentaram pelo menos uma das replicatas positiva. Os resultados foram obtidos na forma de número de parasitos/número de células de cão.

### **3.8.4. Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow (RPA-LF)**

#### **3.8.4.1. Padronização do RPA-LF para amostras de cães com baixo escore clínico**

Os DNAs extraídos a partir do papel Whatman FTA®, tanto de linfonodo como de sangue total do Grupo 1 - primeira coleta em 2016 (n=64), foram utilizados para RPA-LF. Já da segunda coleta (n=82), apenas o linfonodo foi utilizado para análise, uma vez que o sangue total apresentou resultado inferior ao obtido com linfonodo. O protocolo esteve em desenvolvimento ao longo do projeto, tendo como base o descrito por Castellanos-Gonzalez e colaboradores (Castellanos-Gonzalez et al., 2015).

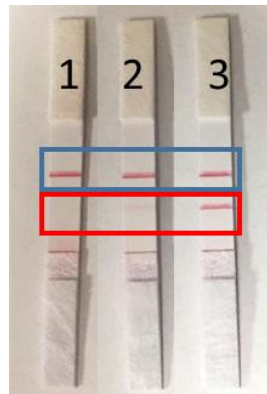
Em um primeiro momento foi realizado um teste com a metodologia padronizada no Laboratório de Doenças Infecciosas-UTMB, que consistia no preparo do mix composto por um par de iniciadores específicos para o kDNA de *Leishmania infantum*, sendo o antisenso biotilado (1µL do iniciador *forward* e 1µL do iniciador *reverse* biotilado) (**Tabela 3.3**), 0,3µL de uma sonda marcada com 6-carboxifluoresceína (FAM) (5µM), 5,7µL de água, 1,25µL de acetato de magnésio e 14,5µL da mistura reidratada (*Kit Twist amp nfo RPA -TwistDx, UK*). Junto ao mix acrescentou-se 2µL de DNA extraído. Em seguida essa mistura foi incubada por 42°C durante 30 minutos. A leitura do resultado foi realizada a partir da diluição 1:20 (5µL produto amplificado + 95µL tampão) em um microtubo de 1,5mL. A ponta inferior da fita de fluxo lateral (Ustar Biotechnologies (Hangzhou) Ltd.) foi então imersa na amostra, de forma que o produto de amplificação fosse capaz de correr para cima por capilaridade. A amplificação do DNA do parasita foi confirmada a olho nu após 5 minutos pelo aparecimento da banda de teste na parte inferior da tira. O produto contendo as extremidades duplamente marcadas (biotina e FAM) se move através da tira de fluxo lateral por capilaridade e é reconhecido por um anticorpo anti-FAM específico marcado com partículas de ouro. Então, como o complexo produto-ouro migra, sendo imobilizado por um anticorpo específico anti-biotina gerando uma banda positiva no centro da fita; o excesso de partículas de ouro não ligado continua a migrar sobre a banda teste e é preso por um anticorpo específico para espécie (anti-camundongo) no final da faixa (faixa de controle) (**Figura 3.9**) (Saldarriaga et al., 2016).

**Tabela 3.3.** Iniciadores e sonda utilizados no RPA-LF para *L. infantum*.

Gene alvo	Sequência (5' - 3')	Tamanho (pb)
S	CCATAGCGCTTTAGAATAGTTCGACTCCGA	
AS	bio- ATCGGTATAGATATTACTACTACACACAGC	182
kDNA <sup>1</sup> Sonda	FAM-ATAACTGACATTACTCGTACACTATAA-THF-TATTATGTTTAATATAT	

S, senso; AS, antisenso; pb, pares de base

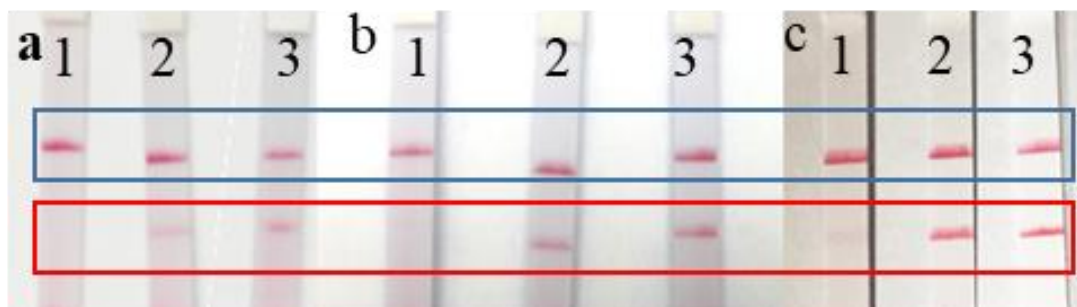
<sup>1</sup> Castellano-Gonzalez, et al., 2015.



**Figura 3.9.** Fitas de fluxo lateral utilizadas na leitura do RPA-LF exemplificando resultados (1) negativo, (2) fracamente positivo e (3) fortemente positivo. Delimitada em azul a banda controle e em vermelho a banda teste.

Durante a padronização do RPA-LF foi realizada a comparação dos resultados obtidos a partir de amostras de aspirado de linfonodo de seis animais, utilizando o DNA extraído do papel de filtro Whatman FTA®. Nesse teste, o material extraído de dois e quatro discos do papel de filtro, ambos medindo 6mm de diâmetro foi avaliado. Observou-se que uma das amostras foi negativa quando utilizado o DNA extraído de dois discos de 6mm de diâmetro, mas positiva quando o RPA-LF foi feito com o material oriundo da extração de quatro discos de 6mm de diâmetro, sendo essa amostra positiva na qPCR com iniciador para kDNA. As outras amostras obtiveram resultados concordantes. Baseado neste teste, optou-se por manter a extração de quatro discos de 6mm de diâmetro como protocolo.

Uma vez definido o protocolo a ser seguido para extração de DNA, seguimos para a padronização do volume de DNA a ser aplicado na reação. Para isso, foram utilizados inicialmente 2µL de DNA extraído. Entretanto utilizando essa concentração nos testes iniciais e comparando com o resultado obtido na PCR em tempo real, observamos uma menor positividade. Dessa forma foram realizados novos testes alterando o volume de DNA extraído para 0,5µL, caso estivesse havendo uma inibição da reação em função da alta concentração de DNA e 5µL, caso o inverso estivesse acontecendo e houvesse pouco material na reação para ser amplificado. Obtivemos então, o melhor resultado com a utilização de 5µL de DNA para reação, concentração que foi utilizada para os demais testes (**Figura 3.10**).



**Figura 3.10.** Padronização da RPA-LF para as amostras clínicas, utilizando diferentes concentrações de DNA. Delimitada em azul está a banda controle e em vermelho a banda teste. (a) 0,5µL de DNA: 1=negativo; 2 e 3= positivo fraco (b) 2µL de DNA: 1=negativo; 2=positivo moderado; 3= positivo forte. (c) 5µL: 1= positivo fraco; 2 e 3=positivo forte

Como o resultado ainda ficou abaixo do esperado, o protocolo continuou sendo alterado em conjunto com os pesquisadores do Laboratório de Doenças Infecciosas – UTMB, sendo então alterado o volume de iniciadores, resultando em um mix contendo 2,4 µL do iniciador *forward*, 2,4µL do iniciador *reverse* biotinilado, 0,3µL da sonda contendo FAM, 3,3 µL de água, 14,5µL *Twist amp nfo RPA kit* (TwistDx, UK), 1,25µL de acetato de magnésio. Junto ao mix acrescentou-se 2,5µL de DNA extraído. A temperatura de incubação foi mantida em 42°C. Para leitura do resultado, foi realizado a diluição de 1:50 (2µL produto amplificado + 98µL tampão), utilizando as mesmas fitas de fluxo lateral.



### 3.8.4.2. Protocolo de RPA-LF

Após a padronização realizada, as amostras de aspirado de linfonodo do Grupo 1 foram testadas utilizando o protocolo descrito no **Quadro 3.1**.

**Quadro 3.1.** Protocolo utilizado nas reações de RPA-LF do estudo.

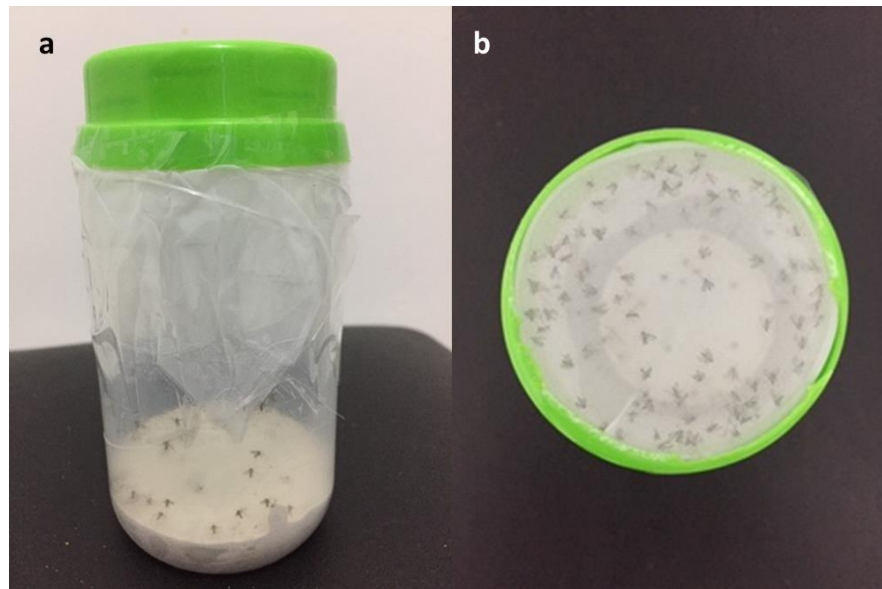
Reagente	Volume (µL)
Iniciador <i>forward</i>	2,4
Iniciador <i>reverse</i> biotinilado	2,4
Sonda contendo FAM	0,3
Água	3,3
<i>Twist amp nfo RPA kit</i> (Twistdx, UK)	14,5
Acetato de magnésio	1,25
<b>DNA</b>	2,5
<b>Volume Final</b>	<b>26,65</b>

A temperatura de incubação foi de 42°C. Para leitura do resultado, foi realizado a diluição de 1:50 (2µL produto amplificado + 98µL tampão), utilizando as fitas de fluxo lateral *Ustar Biotechnologies (Hangzhou) Ltd*. O resultado foi obtido por meio de leitura visual, sendo classificado em positivo quando houve aparecimento da banda teste e negativo quando a banda teste estava ausente. A intensidade da banda teste também foi avaliada, sendo como: + (fraca), ++ (moderado) e +++ (forte). A classificação da intensidade das bandas foi realizada pelo mesmo observador para todas as amostras.

### 3.9. Xenodiagnóstico

O potencial dos cães de infectar o vetor foi determinado por meio de xenodiagnóstico nos cães que foram acompanhados, totalizando 40 cães na visita realizada em abril de 2018 e 28 cães na visita realizada em agosto de 2018. Para o xenodiagnóstico, foram utilizados *Lu. Longipalpis* pertencentes a colônia do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do Instituto Oswaldo Cruz. Os flebotomíneos foram transportados em recipientes de plástico vedados contendo 50 fêmeas cada um. Estes recipientes possuíam gesso na base visando manter a umidade, e malha fina na parte superior que permitia a alimentação dos insetos, sem a necessidade de manipulação dos mesmos após o repasto sanguíneo (**Figura 3.11**). Os

recipientes individuais foram transportados aos domicílios em contêineres com a temperatura e umidade controlada. As fêmeas foram mantidas com alimentação por glicose até 24 horas antes da realização do xenodiagnóstico.



**Figura 3.11.** Recipiente plástico vedado contendo fêmeas de flebotomíneos utilizado no xenodiagnóstico. Em (a) visão lateral e (b) visão frontal dos recipientes.

Os xenodiagnósticos foram realizados em abril e agosto de 2018. Para isso, os cães foram submetidos a sedação por aplicação pela via intramuscular acepromazina 0,2% (Acepran 0,2%®, Vetnil) na dose de 0,2 mg/kg (0,1 mL/kg). Para os animais mais agitados /agressivos, foi necessária uma sedação, a qual foi realizada pela aplicação pela via intramuscular de Cloridrato de Dexmedetomidina 0,5mg/mL (Dexdomitor®, Zoetis), na dose de 500 µg/m<sup>2</sup>. Em seguida, foi posicionado a parte de malha fina dos potes contendo os flebotomíneos sobre a face interna do pavilhão auditivo dos cães, e coberto com tecido escuro. A exposição dos cães aos flebotomíneos foi mantida durante 30-40 minutos (Travi et al., 2001) (**Figura 3.12**). Ao fim do procedimento, para os cães sedados com Dexmedetomidina, foi aplicado o reversor, Cloridrato de Atipamezole 5mg/ml (Antisedan®, Zoetis), na dose de 5.000 µg/m<sup>2</sup>, também pela via intramuscular.



**Figura 3.12.** a) Xenodiagnóstico sendo realizado em animal anestesiado. Nota-se pano preto cobrindo o pote contendo os flebótomos durante o procedimento. b) Ênfase no posicionamento do pote na orelha do animal durante o procedimento. Imagens do arquivo pessoal.

Durante todo procedimento os animais foram acompanhados pelo médico veterinário, sendo monitorados a temperatura, frequência cardíaca, respiratória, teste de perfusão capilar (TPC) e coloração da mucosa. Somente foi liberado o animal, após ele conseguir ficar de pé e com deambulação normal. Ao fim do procedimento, o animal recebeu uma coleira impregnada com 4% de Deltametrina (Scalibor®, MSD Saúde Animal).

Após 2-5 dias da alimentação, visando aguardar o estabelecimento da infecção no vetor, os frascos foram colocados em geladeira. Uma vez constatada a morte dos insetos, estes foram alocados em microtubos de 1,5mL contendo etanol a 95% para posterior análise.

### 3.9.1. Avaliação da Capacidade de Infectar o Vetor

A partir dos microtubos contendo flebotomíneos, foram separados *pools* contendo dez fêmeas em cada um para a extração do DNA.

A extração do DNA foi realizada pelo kit de extração *Gentra Puregene Tissue Kit* (QIAGEN), segundo orientações do fabricante. Foi realizada incubação *overnight* com a solução de lise celular e proteinase K (20mg/ml). O DNA foi eluído em 25µL. Um controle negativo formado pelo *pool* contendo dez fêmeas de flebotomíneos oriundas da colônia do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do Instituto Oswaldo Cruz, que não foram utilizadas no xenodiagnóstico, teve o DNA extraído em conjunto com as amostras.

Embora tenha sido utilizada a PCR quantitativa em função da maior sensibilidade, a análise da capacidade de infectar o vetor foi realizada de forma qualitativa. Para isso utilizou-se os iniciadores direcionados para a amplificação da subunidade 18S do RNA ribossomal de *Leishmania* sp. (ssrRNA) (Prina et al., 2007) e o gene constitutivo de flebotomíneos gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Martins, 2015) (**Tabela 3.4**).

**Tabela 3.4.** Genes alvos e desenho dos iniciadores utilizados na PCR em tempo real com amostras de flebotomíneos.

Gene Alvo		Sequência 5´-3´	Tamanho (pb)
ssrRNA <sup>1</sup>	S	TACTGGGGCGTCAGAG	153
	AS	GGGTGTCATCGTTTGC	
GAPDH <sup>2</sup>	S	TTCGCAGAAGACAGTGATGG	150
	AS	CCCTTCATCGGTCTGGACTA	

S, senso; AS, antisenso; pb, pares de base

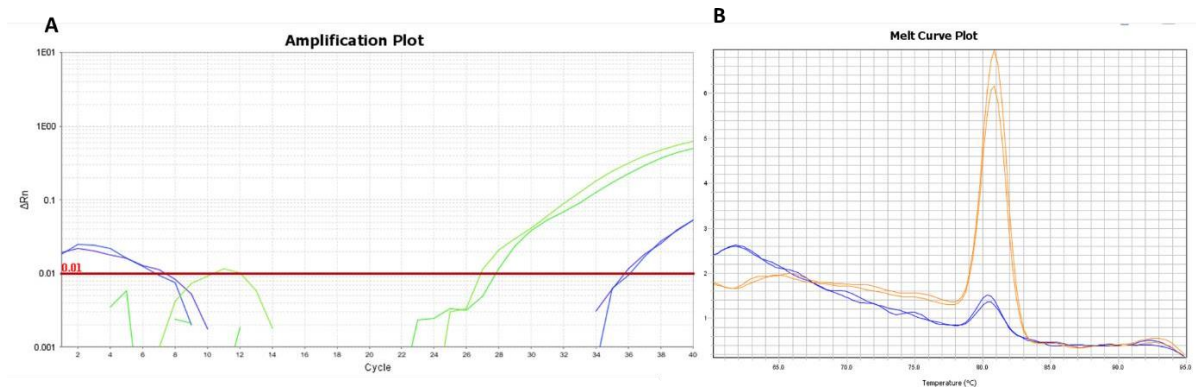
<sup>1</sup>Prina, et al., 2007. <sup>2</sup>Martins., 2015.

O DNA total foi adicionado a um volume final de 10,0 µL contendo 5,0 µL Power Up *SYBR Green Master Mix* 1X (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc.), 1 µL de cada iniciador para GAPDH (2,5mM) ou 0,5µL para ssrRNA (10mM) e água livre de nucleases.

As reações foram preparadas em placas de 384 poços mediante sistema automatizado de pipetagem epMotion 5070® (Eppendorf) visando minimizar contaminação. As reações foram realizadas no equipamento ViiA7® (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc.) com temperatura de ativação de 95°C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos a 95°C / 15 segundos, 60°C / 1 minuto. Uma curva de dissociação (95°C / 15 segundos, 60°C / 1 minuto e 95°C / 15 segundos) foi realizada para avaliação de amplificação inespecífica. Todas as reações foram feitas em duplicata para cada alvo e ambos os alvos foram executados em poços diferentes na mesma placa para a mesma amostra. Controles negativos de extração, controles positivos e a água utilizada foram incluídos em todas as placas.

Para a avaliação da capacidade de infectar o vetor, a qPCR foi utilizada de forma a identificar a presença/ausência de DNA de *Leishmania* em cada *pool* contendo dez fêmeas de flebotomíneos (**Figura 3.13**). A confirmação da positividade foi realizada através da comparação das temperaturas de dissociação obtidas nas amostras e controle positivo. Tal estratégia de análise foi utilizada, pois os insetos foram mortos de dois a cinco dias, uma vez que pelo estresse do transporte e manipulação, alguns insetos morreram antes dos cinco dias.

Como existe uma variação na multiplicação do parasita no interior do inseto, a quantificação em diferentes momentos desse ciclo, poderia nos levar a resultados errôneos, não permitindo, portanto, uma classificação dos flebotomíneos em mais ou menos infectados.



**Figura 3.13.** Exemplos de dois resultados encontrados da qPCR com iniciadores para *ssrRNA* de dois diferentes pools de fêmeas de flebotomíneos. (a) Curva de amplificação. (b) Curva de dissociação.

Dessa forma, para a comparação da capacidade de infectividade de cada cão para o inseto vetor, realizou-se o cálculo da taxa de infecção mínima (TI), que é calculada considerando que apenas uma fêmea de cada *pool* esteja infectada, utilizando para isso, a fórmula  $TI = \text{número de } pools \text{ positivos} \times 100 / \text{número total de insetos}$  (Paiva et al., 2006).

### 3.10. Análise Estatística

O programa RStudio (Version 3.5.1) foi utilizado para o cálculo de sensibilidade, especificidade, prevalência real e aparente, valores preditivos positivos e negativos, razão de verossimilhança positiva e negativa. O teste de Shapiro-Wilk disponível no software IBM® SPSS® Statistics – Versão 25 foi utilizado para verificar a distribuição de normalidade dos dados, sendo os dados classificados como com uma distribuição não paramétrica. O Prism 7 para Windows (Graphpad Prism® versão 7.04) foi utilizado para o estabelecimento das correlações, associações e elaboração dos gráficos. O teste de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e qui-quadrado foram utilizados para variáveis com distribuição não paramétrica. Já as correlações foram determinadas usando o coeficiente de correlação de Spearman. Cada um dos parâmetros analisados e os métodos de análise foram descritos na legenda de cada figura. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

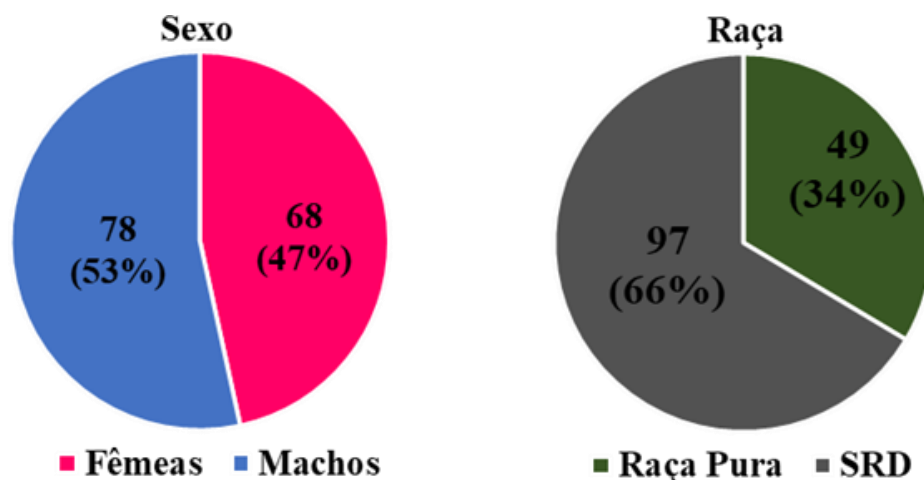
Para a avaliação da utilização do DPP<sup>®</sup>LVC de forma semiquantitativa, foi necessário separar os cães em grupos. Dividiu-se os animais em dois grupos, alta e baixa carga parasitária definido pela carga parasitária, usando o número estimado de log de parasita por 10<sup>6</sup> (base 10) para cada amostra. O valor de corte que delimitou ambos os grupos foi otimizado pela distribuição normal utilizando o algoritmo de expectativa-maximização (EM) onde foi testada a probabilidade máxima de cada amostra estar inserida na hipótese nula ou não, ou seja, para testar a hipótese da amostra seguir a distribuição normal. Para tal, foram aplicadas 1.000 permutações para testar a hipótese nula do componente K, que é uma variável de teste, *versus* a hipótese do componente k+1 até um número específico de componentes máximos, K (K=5). O valor de p foi calculado para cada teste, e uma vez que o valor de p estava acima do nível de significância (p>0,05), o teste foi determinado, ou seja, a sua amostra foi classificada como seguindo a distribuição normal. A análise foi realizada utilizando o *Mixtool library* para o R statistical package version 2.922. Dessa forma, dois grupos robustos foram definidos, um com baixa e outro com alta carga parasitária (Cavalcanti et al., 2015).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização do Grupo de estudo

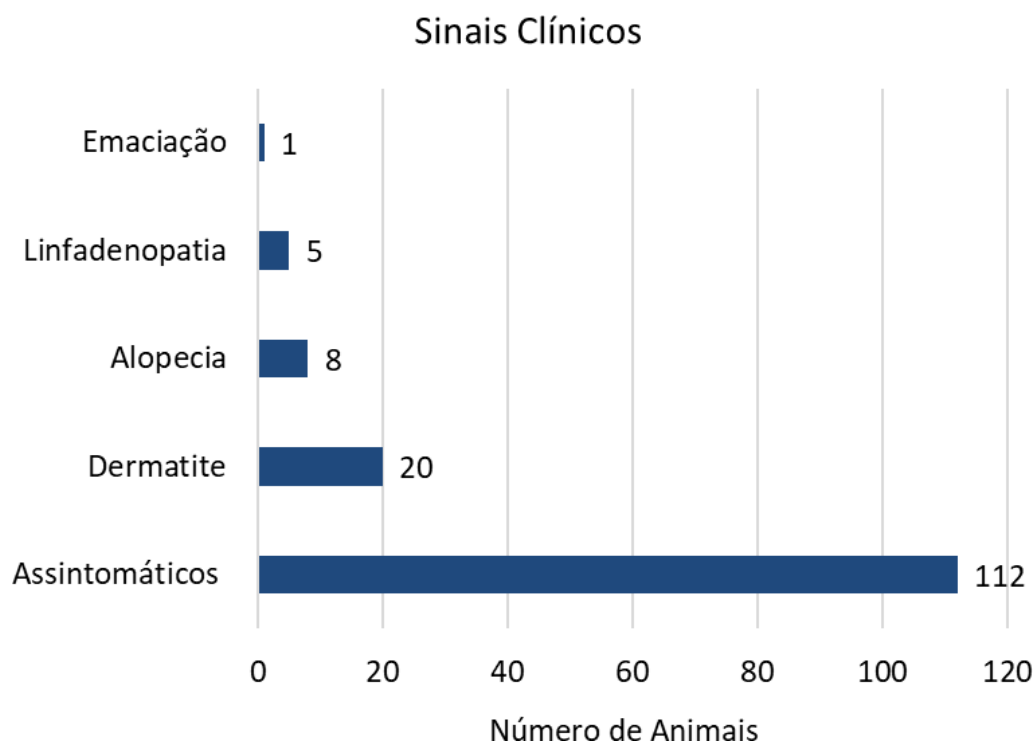
#### 4.1.1 Grupo 1

Para o Grupo 1, foram selecionados 146 animais, todos domiciliados/semi-domiciliados, dos quais foram coletadas amostras de sangue periférico, aspirado de linfonodo, informações clínicas e demográficas. A distribuição dos animais quanto ao sexo e raça pode ser observada na **Figura 4.1**. Os 49 (34%) cães com raça pura estão distribuídos da seguinte forma: Beagle (1), Boiadeiro-Australiano (4), Dachshund (1), Fila Brasileiro (1), Labrador Retriever (1), Lhasa Apso (1), Pinscher (9), American Pit Bull Terrier (3), Poodle (22), Shih Tzu (4) e Yorkshire Terrier (2).



**Figura 4.1.** Distribuição dos 146 animais do Grupo 1 de acordo com sexo e raça.

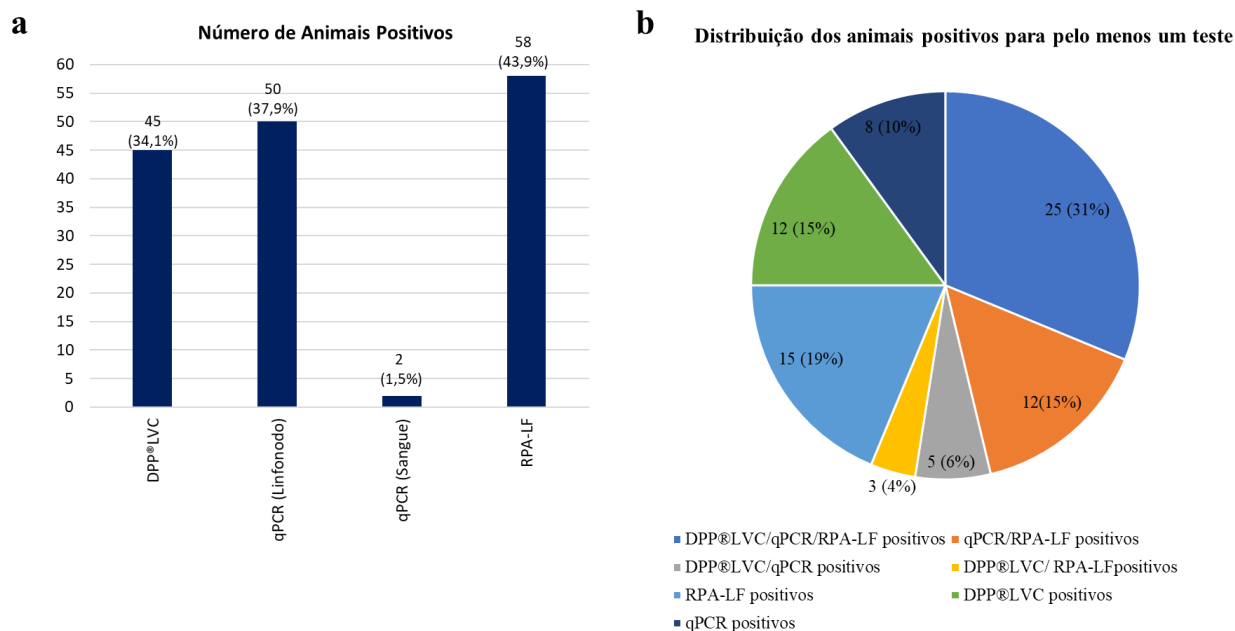
Animais com até um sinal clínico leve foram incluídos, configurando um valor baixo de escore clínico. A distribuição de sinais clínicos mais frequentes foi demonstrada na **Figura 4.2**. De acordo com os critérios de inclusão adotados, a maior parte dos animais que participaram do estudo eram assintomáticos com escore clínico igual a zero (N=112; 76,7%). Dentre os animais que apresentavam escore clínico igual a um (N=34, 23,3%), o sinal clínico mais presente foi a dermatite (N=20).



**Figura 4.2.** Distribuição dos 146 animais do Grupo 1 quanto a presença e tipo de sinal clínico.

A **Figura 4.3a** representa a distribuição dos animais do Grupo de acordo com a positividade dos testes realizados. Ao considerarmos todos os testes realizados, obtivemos uma positividade de 60,6% (80/132) animais positivos em pelo menos um dos testes realizados. Os animais que não tiveram suas amostras de aspirado de linfonodo conservadas em RNA Later® amplificadas pelo iniciador direcionado para gene de referência HPRT (N=14) foram excluídas dessa análise. A **Figura 4.3b** representa a distribuição dos animais de acordo com a positividade para todos os testes realizados. Nela podemos observar que parte dos animais foram positivos para mais de um teste (N=45, 34,1%), enquanto outros foram positivos para apenas um teste (N=35, 26,5%).





**Figura 4.3. a.** Distribuição dos animais quanto a positividade para cada teste realizado. **b.** Distribuição dos animais positivos para pelo menos um dos testes (N=80). Nesta figura foram considerados positivos para qPCR de linfonodo, os animais que apresentaram amplificação para os iniciadores que codificam região do *ssrRNA* e/ou *kDNA*.

A descrição dos animais positivos, seus respectivos sinais clínicos e resultados de cada teste diagnóstico realizado estão descritos no **Anexo II**.

Os resultados obtidos em todos os testes foram comparados e expressos em formas de tabelas de 2x2 no **Quadro 4.1**. A concordância obtida entre os testes variou de 66,6% (88/132) a 83,3% (110/132). A comparação de testes que obteve o maior número de resultados concordantes foi a entre as PCR em tempo real realizadas com iniciador para *kDNA* e *ssrRNA* com 110 (83,3%) resultados semelhantes. Seguida, pela PCR em tempo real com iniciador para *ssrRNA* com RPA-LF com amostras de linfonodo e DPP@LVC, com resultados concordantes em 104 (78,8%) e 102 (77,3%), respectivamente. Para este cálculo, mais uma vez somente foram considerados os animais que apresentaram amplificação para o gene de referência *HPRT* (N=132).

**Quadro 4.1.** Avaliação da concordância entre os resultados dos testes realizados nos 132 animais do Grupo 1. Em azul, se encontram os resultados concordantes positivos e negativos.

		PCR ssrRNA		
		+	-	Total
PCR kDNA	+	<b>28 (21,2%)</b>	17 (12,9%)	45 (34,1%)
	-	5 (3,8%)	<b>82 (62,1%)</b>	87 (65,9%)
<b>Total</b>		33 (25,0%)	99 (75,0%)	132 (100%)
<b>Resultados concordantes</b>		<b>110 (83,3%)</b>		
		PCR ssrRNA		
		+	-	Total
RPA-LF (Linfonodo)	+	<b>30 (22,7%)</b>	25 (18,9%)	55 (41,6%)
	-	3 (2,3%)	<b>74 (56,0%)</b>	77 (58,3%)
<b>Total</b>		33 (25,0%)	99 (75,0%)	132 (100%)
<b>Resultados concordantes</b>		<b>104 (78,8%)</b>		
		PCR ssrRNA		
		+	-	Total
DPP®LVC	+	<b>24 (18,2%)</b>	21 (15,9%)	45 (34,1%)
	-	9 (6,8%)	<b>78 (59,1%)</b>	87 (65,9%)
<b>Total</b>		33 (25,0%)	99 (75,0%)	132 (100%)
<b>Resultados concordantes</b>		<b>102 (77,3%)</b>		
		PCR kDNA		
		+	-	Total
RPA-LF (Linfonodo)	+	<b>34 (25,8%)</b>	21 (15,9%)	55 (41,7%)
	-	11 (8,3%)	<b>66 (50,0%)</b>	77 (58,3%)
<b>Total</b>		45 (34,1%)	87 (65,9%)	132 (100%)
<b>Resultados concordantes</b>		<b>100 (75,8%)</b>		
		PCR kDNA		
		+	-	Total
DPP®LVC	+	<b>28 (21,2%)</b>	17 (12,9%)	45 (34,1%)
	-	17 (12,9%)	<b>70 (53,0%)</b>	87 (65,9%)
<b>Total</b>		45 (34,1%)	87 (65,9%)	132 (100%)
<b>Resultados concordantes</b>		<b>98 (74,2%)</b>		
		DPP®LVC		
		+	-	Total
RPA-LF (Linfonodo)	+	<b>28 (21,2%)</b>	27 (20,4%)	55 (41,6%)
	-	17 (12,9%)	<b>60 (45,4%)</b>	77 (58,3%)
<b>Total</b>		45 (34,1%)	87 (65,9%)	132 (100%)
<b>Resultados concordantes</b>		<b>88 (66,6%)</b>		

A prevalência aparente e verdadeira, sensibilidade, especificidade, acurácia diagnóstica, valores preditivos e razão de verossimilhança foram calculados para o DPP®LVC, qPCR com iniciador para ssrRNA e RPA-LF com amostras de aspirado de linfonodo utilizando a qPCR para o iniciador kDNA como teste de referência para a infecção. A positividade nos testes moleculares utilizando amostras de sangue total foram muito baixas, não sendo, portanto, levadas em consideração nessa análise. Na **Tabela 4.1**, encontram-se os valores encontrados. Esta técnica foi utilizada como referência, pois foi a que mais apresentou resultados positivos na amostragem utilizada.

**Tabela 4.1.** Prevalência aparente e verdadeira, sensibilidade, especificidade, acurácia diagnóstica, valores preditivos e razão de verossimilhança obtidos utilizando o qPCR com iniciadores para kDNA com amostras de linfonodo armazenado em RNA Later® como teste de referência para determinação da infecção.

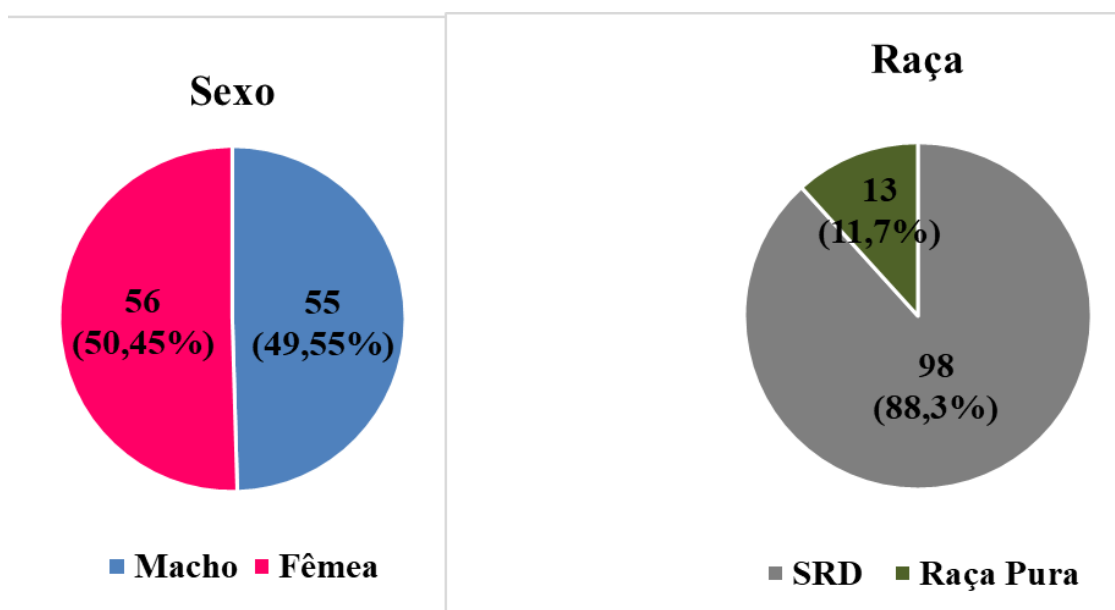
	DPP®LVC	RPA-LF (LN)	qPCR ssrRNA
Prevalência Aparente	34%	42%	25%
	(26% - 43%)	(33% - 51%)	(18% - 33%)
Verdadeira Prevalência	34%	34%	34%
	(26% - 43%)	(26% - 43%)	(26% - 43%)
Sensibilidade	62%	76%	62%
	(47% - 76%)	(60% - 87%)	(47% - 76%)
Especificidade	80%	76%	94%
	(71% - 88%)	(65% - 84%)	(87% - 98%)
Acurácia diagnóstica	74%	75%	83%
	(66% - 81%)	(67% - 83%)	(76% - 89%)
Valor Preditivo Positivo	62%	62%	85%
	(47% - 76%)	(48% - 75%)	(68% - 95%)
Valor Preditivo Negativo	80%	86%	83%
	(71% - 88%)	(76% - 93%)	(74% - 90%)
Razão de Verossimilhança Positiva	3,18	3,13	10,83
	(1,96- 5,16)	(2,08- 4,71)	(4,49- 26,13)
Razão de verossimilhança Negativa	0,47	0,32	0,40
	(0,32- 0,69)	(0,19- 0,55)	(0,27- 0,59)

\* Intervalo de confiança de 95%

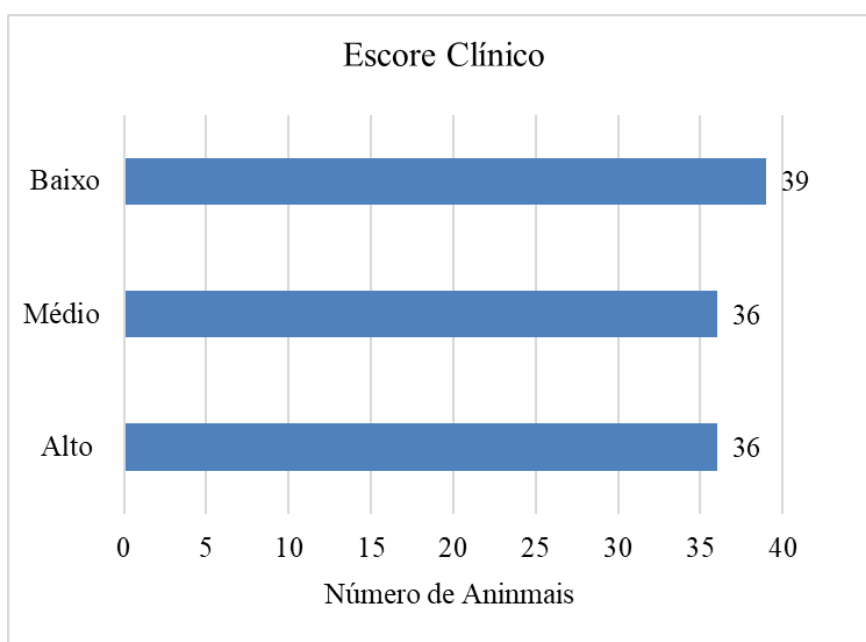
#### 4.1.2. Grupo 2

Já o Grupo 2, foi formado por 111 cães de área endêmica do Mato Grosso, cujas amostras de soro e fragmento esplênicos pertenciam a coleção do Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose. As informações de sexo raça, escore clínico e carga parasitária estavam disponíveis.

As distribuições dos animais quanto o sexo e a raça estão representados na **Figura 4.4**, enquanto a distribuição de acordo com escore clínico está representado na **Figura 4.5**. Os dados detalhados de carga parasitária estão descritos no **Anexo III**.



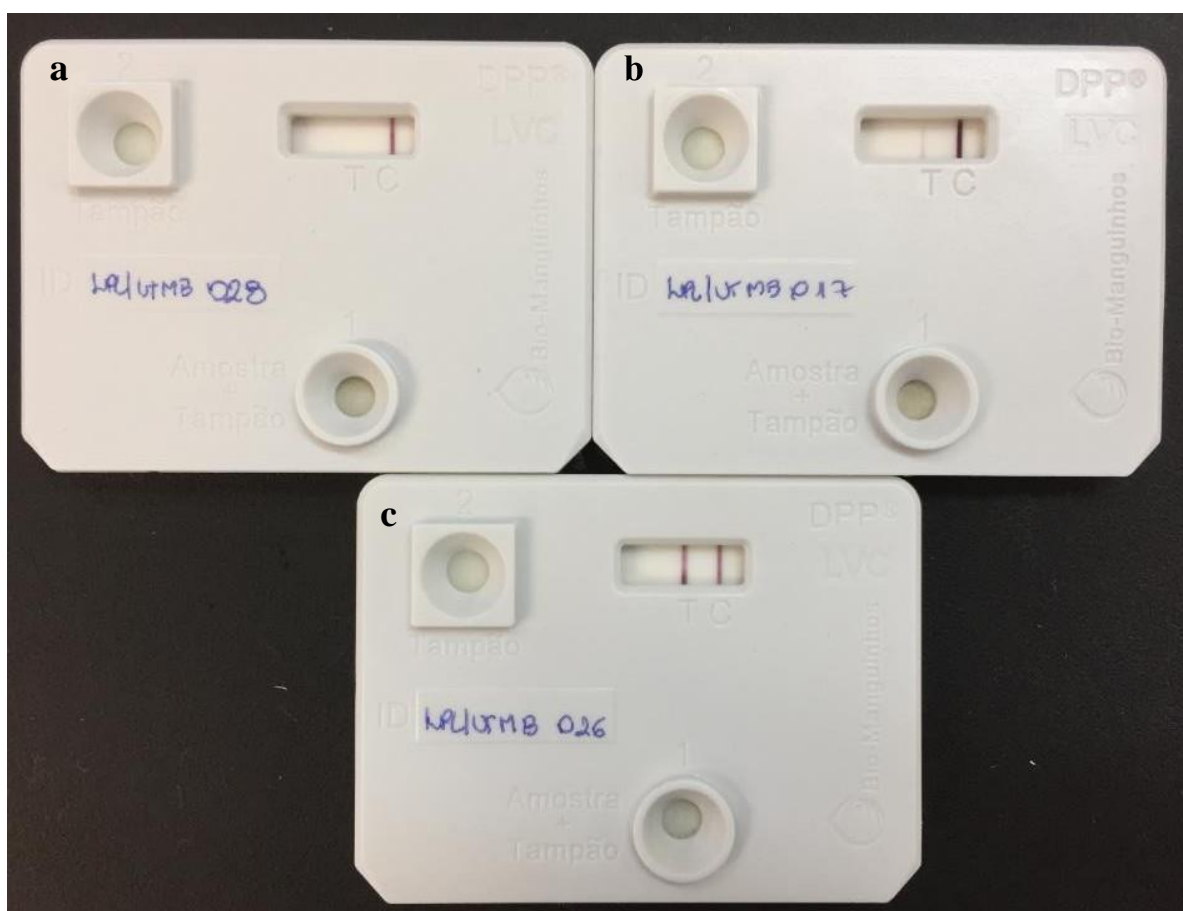
**Figura 4.4.** Distribuição dos 111 animais do Grupo 2 de acordo com sexo e raça.



**Figura 4.5.** Distribuição dos 111 animais do Grupo 2 de acordo com escore clínico.

#### 4.2. Utilização do teste sorológico rápido DPP®LVC no diagnóstico dos cães assintomáticos

O DPP®LVC (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) foi realizado com 5µL de plasma, sempre no Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose-IOC. Um total de 45/146 (30,8%) animais foi positivo sorologicamente. A obtenção do resultado foi através de leitor, sendo obtidos os valores das bandas teste e controle, a fim de calcular o índice de reatividade (IR). Foram positivos no DPP®LVC todos os animais que apresentaram  $IR > 0,05$ . Na **Figura 4.6**, temos o exemplo de três testes DPP®LVC com diferentes intensidades de bandas na leitura visual.



**Figura 4.6.** Exemplo de leitura visual de teste DPP®LVC, representando resultado (a)negativo, (b)positivo fraco e (c)positivo forte.

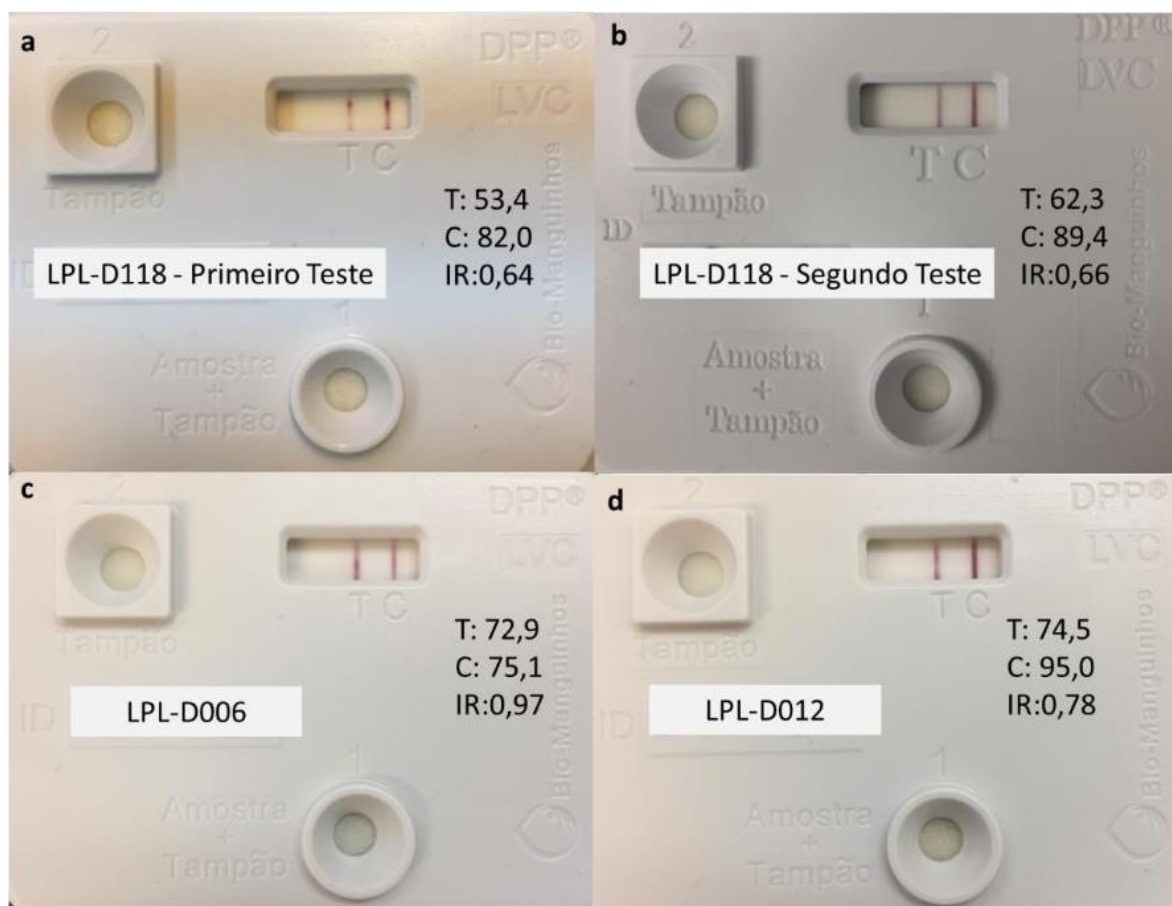
Quando avaliamos a positividade dentro do grupo de assintomáticos (escore clínico=0), observamos que 23,2% (26/112) dos animais eram positivos, enquanto nos cães com sintomas leves de LVC (escore clínico=1), 55,9% (19/34) dos cães apresentaram resultado positivo.

### 4.3. Interpretação dos resultados do teste sorológico rápido DPP®LVC de forma semiquantitativa.

O teste DPP®LVC tem sido usado qualitativamente (positivo ou negativo) para identificar animais infectados. Porém, muitas vezes nos referimos ao resultado como fortemente ou fracamente positivo de acordo com a intensidade da banda teste. Ao utilizarmos um leitor óptico foi possível inferir valores distintos de reatividade pela relação entre a intensidade das bandas teste e controle. Dessa forma, de posse desses valores de intensidade das bandas, foi realizado o cálculo do índice de reatividade (IR) a partir da razão entre a banda teste e a banda controle. Valores diferentes de intensidade das bandas ocorrem devido a níveis distintos de imunoglobulinas específicas e não específicas para *L. infantum* em cães infectados.

De forma a avaliar se o IR permaneceria constante, realizou-se o teste DPP®LVC de um mesmo animal (n=10), utilizando a mesma amostra, em momentos diferentes. Como o cálculo da IR normaliza a possível variação das bandas, não houve mudança do valor de IR obtido (**Figura 4.7a, b**).

Outro ponto relevante é se levar em consideração a banda controle ao avaliar o DPP®LVC de forma semiquantitativa. Na **Figura 4.7 c e d**, é exemplificado um caso, onde ambos os animais apresentam bandas teste semelhante com intensidade 72,9 e 74,5, respectivamente. Mas quando observamos as bandas controle, observamos diferença nas intensidades (75,1 e 95,0). Assim, ao calcularmos a IR, podemos verificar que esses animais apresentam uma proporção diferenciada de anticorpos específicos e não específicos contra o parasito. Informação que seria perdida caso somente a banda teste fosse avaliada, podendo levar a um julgamento errado sobre esses animais, ao classificá-los como iguais.



**Figura 4.7.** Exemplos de DPP®LVC positivos e a aplicabilidade do IR com o uso do leitor ou com leitura visual. Em (a) e (b), a mesma amostra de plasma de um mesmo cão foi submetida a realização do teste em momentos diferentes. Nota-se que mesmo com leituras visuais e de intensidade de banda diferentes, a IR calculada se equipara. Já em (c) e (d), observa-se animais diferentes que apresentam banda teste semelhantes, mas quando utilizado a IR, fica evidenciado que animal c apresenta maior reatividade. T- banda teste (K28r), C- banda controle (Ptn A) e IR – índice de reatividade.

#### 4.3.1. Grupo 2

De forma a validar a aplicabilidade da IR como ferramenta de manejo de cães em áreas endêmicas, inicialmente avaliamos o Grupo 2, formado por 111 animais, distribuídos por escores clínicos em baixo (N=39), médio (N=36) e elevado (N=36), dos quais possuíamos amostras mais invasivas como fragmentos do baço oriundas de necrópsia. Os valores de IR desses cães se encontram disponíveis no **Anexo III**.

Como primeira análise, buscamos estabelecer se haveria alguma correlação entre a IR obtida e os sinais clínicos dos animais do Grupo 2. Independentemente do escore clínico, os valores de IR foram amplamente distribuídos, variando de 0 - 4,07, 0 - 3,63 e 0,03 - 3,86 para

grupos de baixo, médio e elevado escore clínico, respectivamente. Os valores de média, mediana e intervalo interquartil de IR dos diferentes escores clínicos se encontram na **Tabela 4.2**. Uma diferença significativa entre as medianas dos valores de IR ( $p = 0,0094$ ) foi observada entre os grupos de baixo e elevado escore clínico, apresentando o grupo de elevado escore clínico maiores valores de IR em relação ao grupo de baixo escore clínico (**Figura 4.8a**).

**Tabela 4.2.** Média, Mediana e Quartis dos valores de Índice de Reatividade obtidos nos diferentes escores clínicos do Grupo 2.

Escore Clínico	Primeiro Quartil	Mediana	Terceiro Quartil	Média
Baixo	0,08	0,38	1,0	0,67
Médio	0,16	0,88	1,48	1,02
Alto	0,59	0,83	1,44	1,11

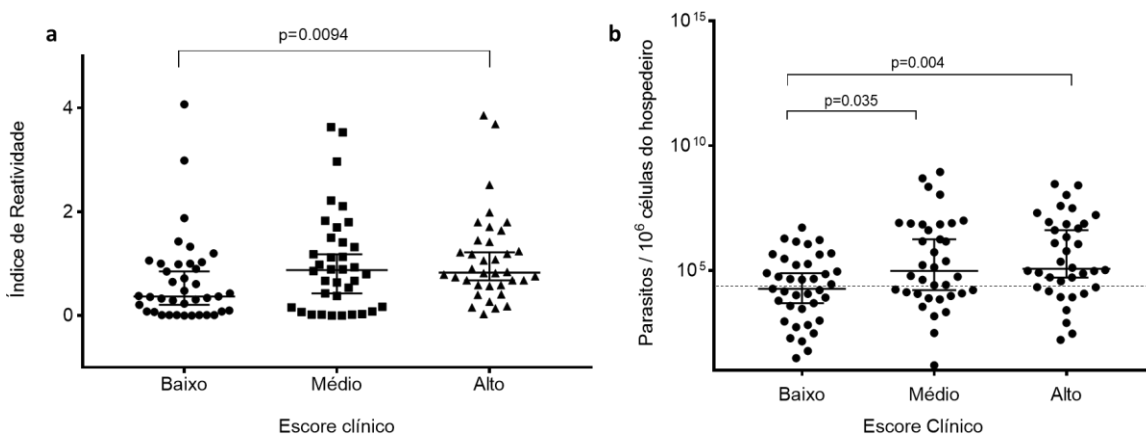
Em seguida, relacionamos a carga parasitária e escore clínico. Considerando-se a carga parasitária, os cães foram separados em dois grupos: grupo de baixa carga parasitária ( $n = 47$ ) variando de  $6,3 \times 10^2$  a  $2,82 \times 10^4$  *Leishmania* /  $10^6$  células de cão e grupo de alta carga parasitária ( $n = 64$ ) variando de  $4,25 \times 10^4$  a  $8,92 \times 10^8$  *Leishmania* /  $10^6$  células de cão. A linha pontilhada da **Figura 4.8b** indica o ponto de corte utilizado para a separação dos animais em baixa e alta carga parasitária. Os valores de média, mediana e intervalo interquartil da carga parasitária dos diferentes escores clínicos se encontram na **Tabela 4.3**. Houve diferença estatística significativa entre as medianas do grupo baixo escore clínico e os outros dois grupos, médio ( $p=0,035$ ) e elevado ( $p=0,004$ ) escore clínico. Os grupos de escore clínico médio e alto não diferiram entre si ( $p>0,99$ ) (**Figura 4.8b**).

**Tabela 4.3.** Média, Mediana e Quartis da carga parasitária em parasitos/ $10^6$  células do hospedeiro obtidos nos diferentes escores clínicos do Grupo 2.

Escore Clínico	Primeiro Quartil	Mediana	Terceiro Quartil	Média
Baixo	$9,79 \times 10^2$	$1,83 \times 10^4$	$1,82 \times 10^5$	$3,581 \times 10^5$
Médio	$1,17 \times 10^4$	$9,72 \times 10^4$	$7,03 \times 10^6$	$4,94 \times 10^7$
Alto	$2,11 \times 10^4$	$1,17 \times 10^5$	$7,44 \times 10^6$	$2,23 \times 10^7$

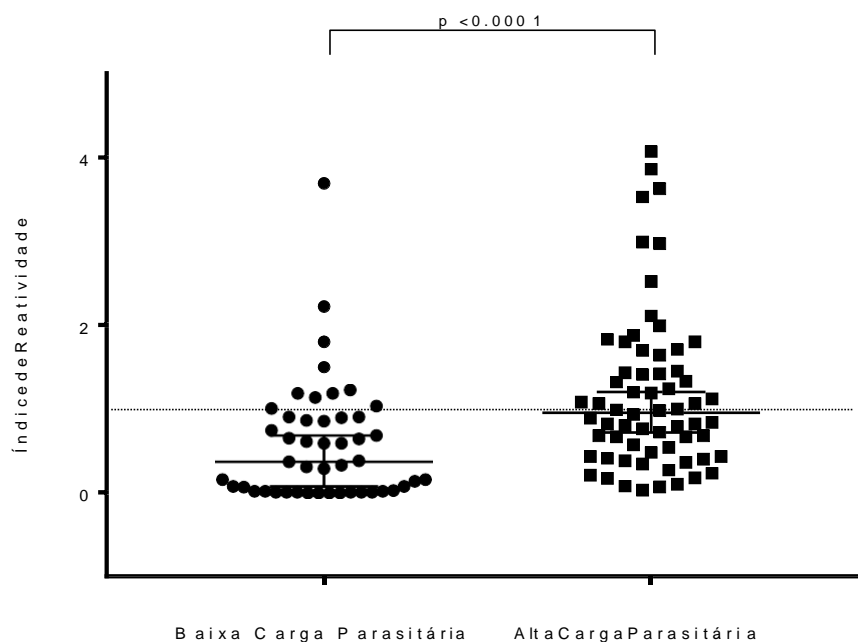


Embora não seja possível prever a expressão clínica da LVC avaliando a carga parasitária de um animal individualmente, os resultados indicam que o agravamento das manifestações clínicas pode estar relacionado ao aumento da carga parasitária ou que a carga parasitária aumenta devido à evolução clínica (**Figura 4.8b**).



**Figura 4.8.** Valores de DPP@LVC e qPCR com o escore clínico de cães com LVC. **(a)**Valores de Índice de reatividade (IR) obtidos com o DPP@LVC para os diferentes escores clínicos. **(b)**Números de correlatos de parasitos obtidos com qPCR para o gene *ssrRNA* de *Leishmania* no baço de cães com LVC para cada nível de escore clínico. Representado a Média com Desvio Padrão. Linha pontilhada representa o valor de corte para baixa e alta carga parasitária. Teste de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ . Cada ponto corresponde a um animal. Linhas contínuas representam a Mediana com 95% de intervalo de confiança. Linha pontilhada representa o valor de corte para baixa e alta carga parasitária.

Uma outra abordagem realizada, foi a comparação dos valores de IR com carga parasitária (**Figura 4.9**). Os valores de média, mediana e intervalo interquartis de IR nos grupos de animais com alta e baixa carga parasitária se encontram na **Tabela 4.4**.



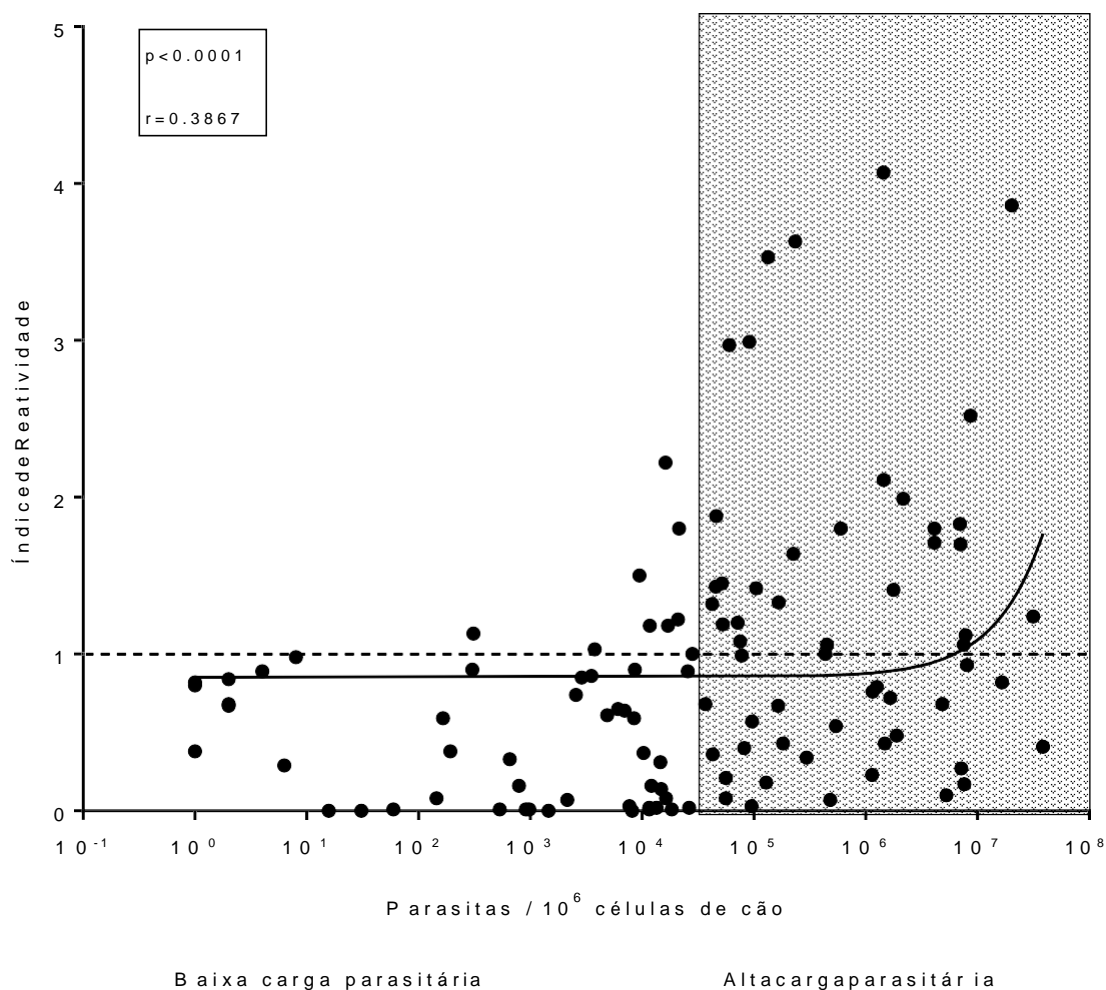
**Figura 4.9.** Associação entre os valores de Índice de reatividade (IR) obtidos com o DPP®LVC e carga parasitária do baço de cães com LVC. Teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ . Cada ponto corresponde a um animal. Linhas contínuas representam a Mediana com 95% de intervalo de confiança. Linha pontilhada representa o  $IR=1$ .

**Tabela 4.4.** Média, Mediana e Quartis dos valores de Índice de Reatividade obtidos em alta e baixa carga parasitária no Grupo 2.

Carga Parasitária	Primeiro Quartil	Mediana	Terceiro Quartil	Média
Baixo	0,0200	0,3500	0,8975	0,5763
Alto	0,4550	0,980000	1,5450	1,1751

Considerando a classificação de alta e baixa carga parasitária, o IR para animais com alta carga parasitária teve maior mediana que a dos animais com baixa carga parasitária (valor  $P < 0,0001$ ). Assim temos que os animais que apresentavam IR de menor valor pertencem preferencialmente ao grupo de menor carga parasitária e os com maior valor de IR se concentram no grupo de alta carga parasitária. Esta observação indica que os anticorpos específicos refletem parcialmente a carga parasitária. Entretanto, não foi possível observar essas características em todos os animais, havendo animais com baixa carga parasitária e alto valor de IR, assim como o oposto também é observado. No entanto, se considerarmos um alto nível de produção de anticorpos específicos, representados por cães com  $IR \geq 1,0$ , apenas oito cães com baixa carga parasitária foram incluídos (**Figura 4.9**)

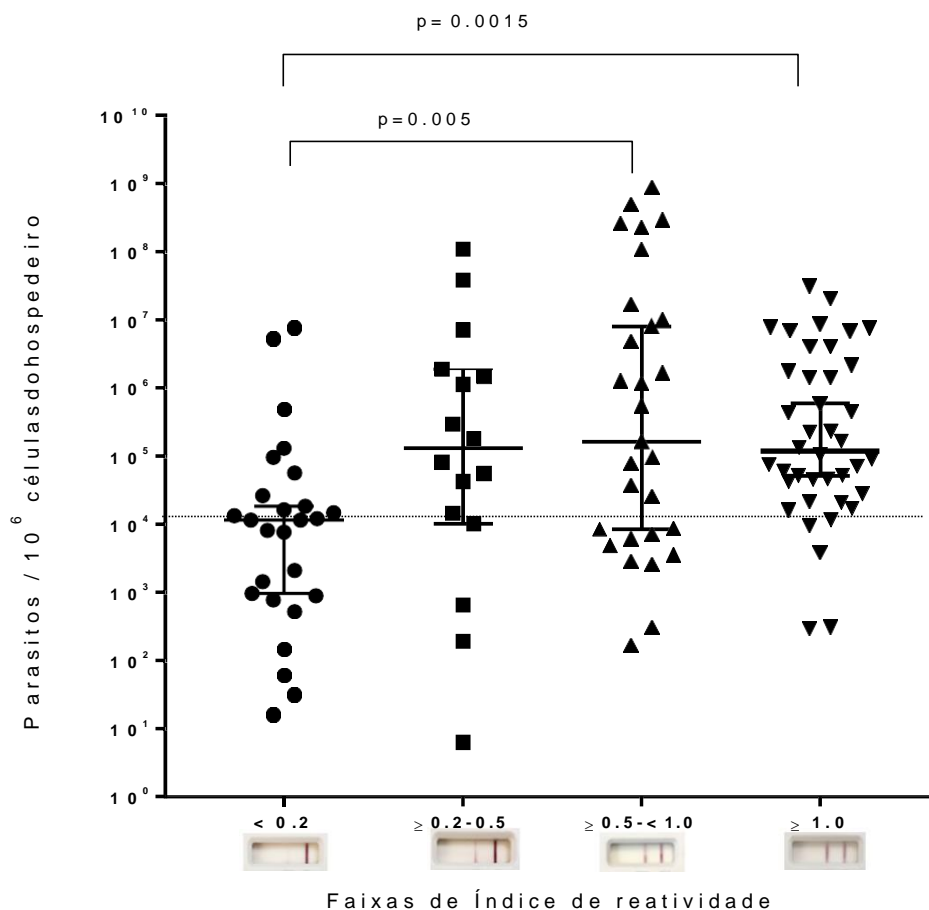
Utilizando a análise de correlação de Spearman (**Figura 4.10**), obtivemos uma correlação positiva e significativa ( $p < 0,0001$ ), mas com baixo coeficiente de correlação ( $r = 0,3867$ ) entre os valores de IR e carga parasitária, justificado principalmente pelo grande número de animais com  $IR \leq 1,0$  e cargas parasitárias baixa, o que denota a importância de um escalonamento intermediário para estes animais.



**Figura 4.10.** Correlação entre os valores de Índice de reatividade (IR) obtidos com o DPP®LVC e a carga parasitária esplênica obtidas com qPCR para o gene *ssrRNA* de *Leishmania*. Teste de correlação de Spearman,  $p < 0,05$ . Cada ponto se trata de um animal. Linha contínua representa a correlação existente entre IR e carga parasitária. Linha pontilhada corresponde ao  $IR = 1$ . Região cinza corresponde a área onde os animais com alta carga parasitária se encontram.

Uma vez estabelecida a correlação entre carga parasitária e índice de reatividade, foi realizado uma escala de classificação para a IR. Essa escala foi determinada de forma que

mesmo com o leitor indisponível, a mesma classificação poderia ser obtida pela leitura visual. Assim, os valores IR foram considerados na forma de faixas, variando de:  $IR < 0,2$ ,  $0,2 \leq IR \leq 0,5$ ,  $0,5 \leq IR < 1,0$  e  $IR \geq 1,0$ , que são os intervalos correspondentes a 20%, 20-50% 50-100% ou > 100% comparando com a banda de controle (**Figura 4.11**). O segundo passo foi alocar os animais do Grupo 2 nessas faixas de IR e avaliar a associação com a carga parasitária obtida por qPCR com o iniciador para o gene *ssrRNA* em cada intervalo de IR estabelecido. Observamos uma mediana de carga parasitária mais baixa, assim como a dispersão dos resultados dentro do grupo  $IR < 0,2$ , apresentando diferença estatisticamente significativa para os grupos  $0,5 \leq IR < 1,0$  ( $p=0,005$ ) e  $IR \geq 1,0$  ( $p=0,0015$ ). Essa análise foi capaz de discriminar os grupos de animais com o baço mais intensamente parasitados (**Figura 4.11**).



**Figura 4.11.** Relação entre as faixas de IR obtidos com o DPP@LVC e a carga parasitaria esplênica do Grupo 2. Teste de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ . Cada ponto corresponde a um animal. Linhas contínuas representam a Mediana com 95% de intervalo de confiança. Linha pontilhada representa o valor de corte para alta e baixa carga parasitária. Imagens exemplificam leitura visual dos intervalos de IR.

### 4.3.2. Grupo 1

Visando aplicar o conceito do IR em uma área endêmica, onde há um grande desafio, uma vez que existem muitos animais assintomáticos ou com sinais clínicos leves, aplicamos a metodologia proposta nos 146 animais do Grupo 1. Em função da necessidade da coleta de amostras menos invasivas, utilizamos a qPCR das amostras de aspirado de linfonodo como método diagnóstico e para a obtenção da carga parasitária. Como 14 amostras não apresentaram amplificação para o gene HPRT, estes animais foram removidos das análises, sendo o número final de 132 cães. Desses cães, 34% (45/132) foram positivos para DPP®LVC, enquanto 65,9% (87/132) foram negativos, todos os animais negativos apresentaram IR <0,2. Dentre os positivos, 53,3% (24/45) também foram positivos para a qPCR com iniciadores para ssrRNA de *Leishmania*. Entre os negativos, apenas 10,3% (9/87) foram positivos para a qPCR (**Tabela 4.5**). A acurácia diagnóstica, valores preditivos e razão de verossimilhança foram calculadas a partir desses dados. Utilizando um intervalo de confiança de 95%, os valores estimados foram: acurácia diagnóstica de 77% (69% - 84%) , valor preditivo positivo de 53% (38% - 68%), o valor preditivo negativo de 90% (81% - 95%), razão de verossimilhança positiva de 3,43 (2,22 - 5,29) e razão de verossimilhança negativa de 0,35 (0,20 - 0,61).

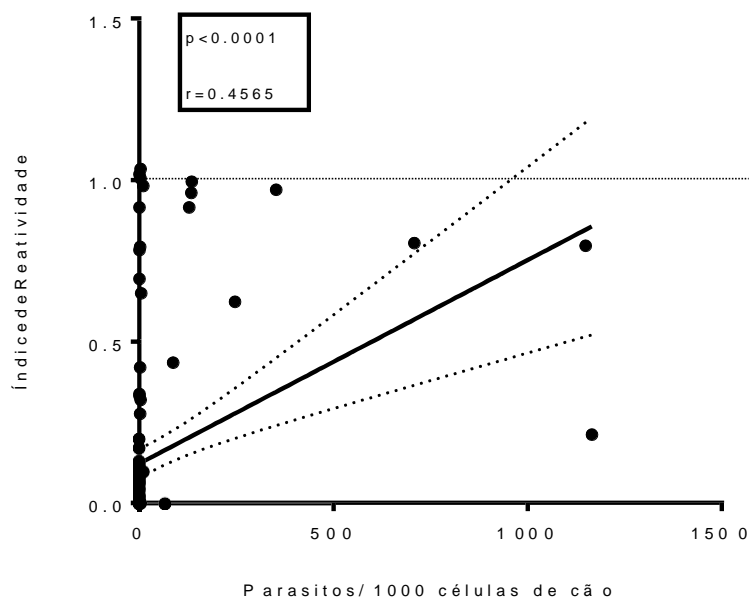
**Tabela 4.5.** Relação entre positividade no teste DPP®LVC e no teste qPCR em amostras de cães com baixo escore clínico de área endêmica.

Dados analisados*	qPCR +	qPCR -	Total
DPP +	24 (18,9%)	21(15,9%)	45 (34,1%)
DPP -	9 (6,8%)	78 (59,0%)	87(65,9%)
<b>Total</b>	33 (25%)	99 (75%)	132 (100%)

\*Frequências de animais positivos e negativos para o DPP®LVC e teste molecular (qPCR) em números absolutos (percentual).

Quando comparada a carga parasitária desses animais com os do Grupo 2, foi observado que a mesma era bem mais baixa, variando de  $9,604 \times 10^2 - 1,165 \times 10^6/10^6$  células hospedeiras, não sendo passível de divisão em grupos com carga parasitária alta e baixa com suporte estatístico, uma vez que somente 10/33 animais apresentam alta carga parasitária. Dessa forma a correlação foi calculada entre as IR e cargas parasitárias obtidas com qPCR com iniciadores para ssrRNA de *Leishmania* a partir das amostras de linfonodo. Foi encontrada uma correlação positiva entre os resultados de IR e a carga parasitária estatisticamente significativa

( $r = 0,4565$ ;  $p < 0,0001$ ), com valor de coeficiente de correlação um pouco maior do que o obtido quando avaliado a IR e a carga parasitária esplênica dos animais do grupo 2 (**Figura 4.12**).



**Figura 4.12** Correlação entre os valores de IR obtidos com o DPP@LVC com a carga parasitária de linfonodos obtidas com qPCR para o gene *ssrRNA* de *Leishmania*. Cada ponto se trata de um animal. Linha contínua representa a correlação existente entre IR e carga parasitária. Linha horizontal pontilhada representa faixa de IR = 1,0. Teste de correlação de Spearman,  $p < 0,05$ .

Aplicando então a divisão em grupos definida com os dados do Grupo 2, os animais do Grupo 1 foram classificados nas faixas de IR. Os 14 cães que não apresentaram amplificação para o gene *HPRT*, foram desconsiderados dessa análise. Observa-se que a maior parte dos animais com  $IR \geq 0,5$  (15/17) apresentam carga parasitária detectável, o mesmo não ocorre com os valores de  $IR < 0,5$ , onde apenas 21/115 animais foi positivo na qPCR com iniciador para *ssrRNA* de *Leishmania* (**Tabela 4.6**).

**Tabela 4.6.** Frequência dos animais positivos do Grupo 2 para a qPCR distribuído nas faixas de IR (DPP@LVC)

	IR < 0,2	0,2 ≤ IR < 0,5	0,5 ≤ IR < 1,0	IR ≥ 1,0	Total
qPCR +	12	6	12	3	33 (
qPCR -	94	3	2	0	99
<b>Total</b>	106	9	14	3	132

IR: índice de reatividade.

Em função do baixo número de cães pertencentes a faixa de IR ≥ 1,0 no Grupo 2, para fim de análises estatísticas, realizou-se uma simplificação da escala proposta, agrupando os valores de IR em IR < 0,5 e IR ≤ 0,5. Analisando esses dois grupos, observa-se que existe uma diferença estatística entre os grupos (p < 0,001) (**Tabela 4.7**).

**Tabela 4.7.** Frequência dos animais positivos do Grupo 1 para a qPCR divididos em apenas duas faixas de IR (DPP@LVC)

	IR < 0,5	IR ≤ 0,5	Total
qPCR +	18 (13,6%)	15 (11,4%)	33 (25,0%)
qPCR -	97 (73,5%)	2 (1,5%)	99 (75,0%)
<b>Total</b>	115 (87,1%)	17 (12,9%)	132 (100%)

Teste Exato de Fisher p < 0,0001

IR: índice de reatividade.

#### 4.4. Utilização da PCR quantitativa em tempo real como forma de diagnóstico molecular e determinação da carga parasitária

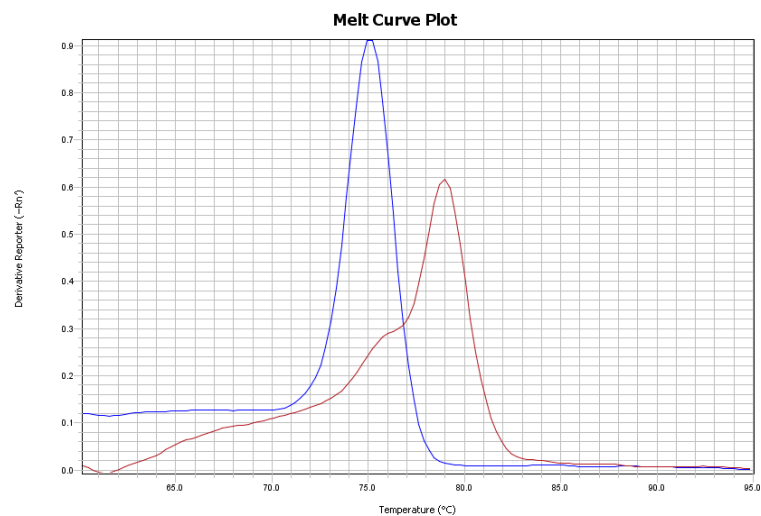
As amostras foram submetidas a duas qPCR, um deles com iniciador para kDNA de *Leishmania* com caráter qualitativo, enquanto o qPCR com iniciador para ssrRNA de *Leishmania* foi usado para diagnóstico e cálculo da carga parasitária.

##### 4.4.1. PCR quantitativa em tempo real com iniciadores para kDNA para diagnóstico molecular

As amostras de aspirado de linfonodo extraídas a partir do papel Whatman FTA® foram utilizadas para essa análise. Como forma de evitar resultados falso negativos, as amostras foram

testadas com iniciadores para o gene 18S de mamíferos. Sendo assim, 132 amostras amplificaram para gene constitutivo de cão, apresentando material necessário para análise, sendo somente essas amostras consideradas nessa análise.

De acordo com Pita-Pereira e colaboradores (2012), a positividade para o subgênero *Leishmania* é dada pela análise da curva de dissociação derivada do fragmento amplificado. Em todas as reações foi incluído um controle positivo para realização dessa comparação. Na **Figura 4.13** há o exemplo de uma amostra considerada positiva. Dessa forma, 34,1% (45/132) cães foram positivos. Os valores *Threshold cycle* (CT) variaram de 6,74 a 30,1 (**Tabela 4.8**). As amostras que apresentaram valores de CT maiores que 30,2 foram considerados negativos.



**Figura 4.13.** Imagem da curva de dissociação obtida após qPCR com iniciadores para kDNA (vermelho) demonstrando padrão esperado para as amostras positivas. Em azul, padrão esperado para o iniciador 18S.



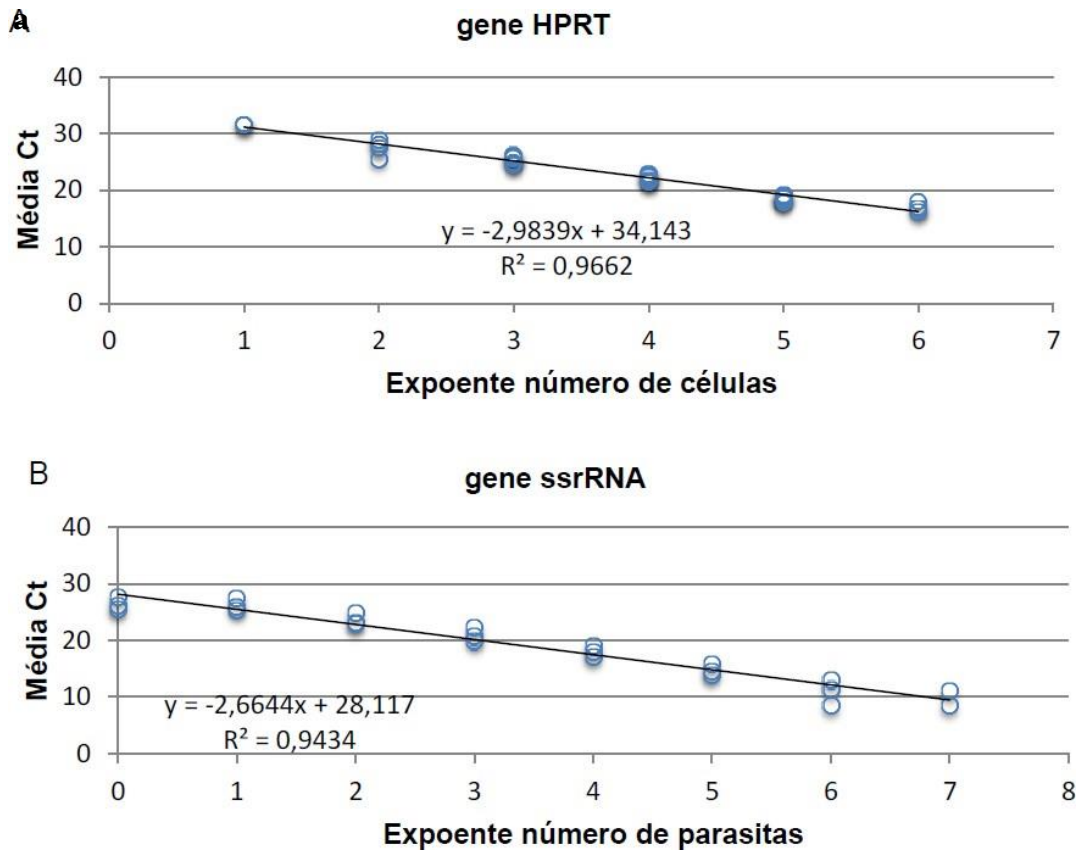
**Tabela 4.8.** Valores *Threshold cycle* obtidos nos animais considerados positivos do Grupo 1 (N=45) na qPCR com iniciadores para kDNA realizada com amostras de aspirado de linfonodo conservadas em papel de filtro.

<b>Animal</b>	<b>CT</b>	<b>Animal</b>	<b>CT</b>
LPL-D007	6,74	LPL-D143	26,1
LPL-D005	6,91	LPL-D083	26,2
LPL-D006	8,30	LPL-D053	26,62
LPL-D026	14,48	LPL-D113	26,7
LPL-D019	16,70	LPL-D049	26,79
LPL-D106	17,4	LPL-D044	26,86
LPL-D070	17,6	LPL-D048	27,37
LPL-D123	19,3	LPL-D068	27,7
LPL-D067	19,6	LPL-D093	27,7
LPL-D147	19,9	LPL-D076	27,8
LPL-D107	20,6	LPL-D012	27,93
LPL-D035	20,78	LPL-D009	27,94
LPL-D008	20,79	LPL-D091	28,5
LPL-D021	20,98	LPL-D122	28,5
LPL-D132	21,4	LPL-D115	28,8
LPL-D060	21,51	LPL-D148	28,8
LPL-D022	22,25	LPL-D119	29,2
LPL-D130	22,3	LPL-D125	29,3
LPL-D131	23,3	LPL-D105	29,6
LPL-D118	24,3	LPL-D030	29,89
LPL-D055	24,49	LPL-D001	29,99
LPL-D052	24,65	LPL-D103	30,1
LPL-D045	25,03		

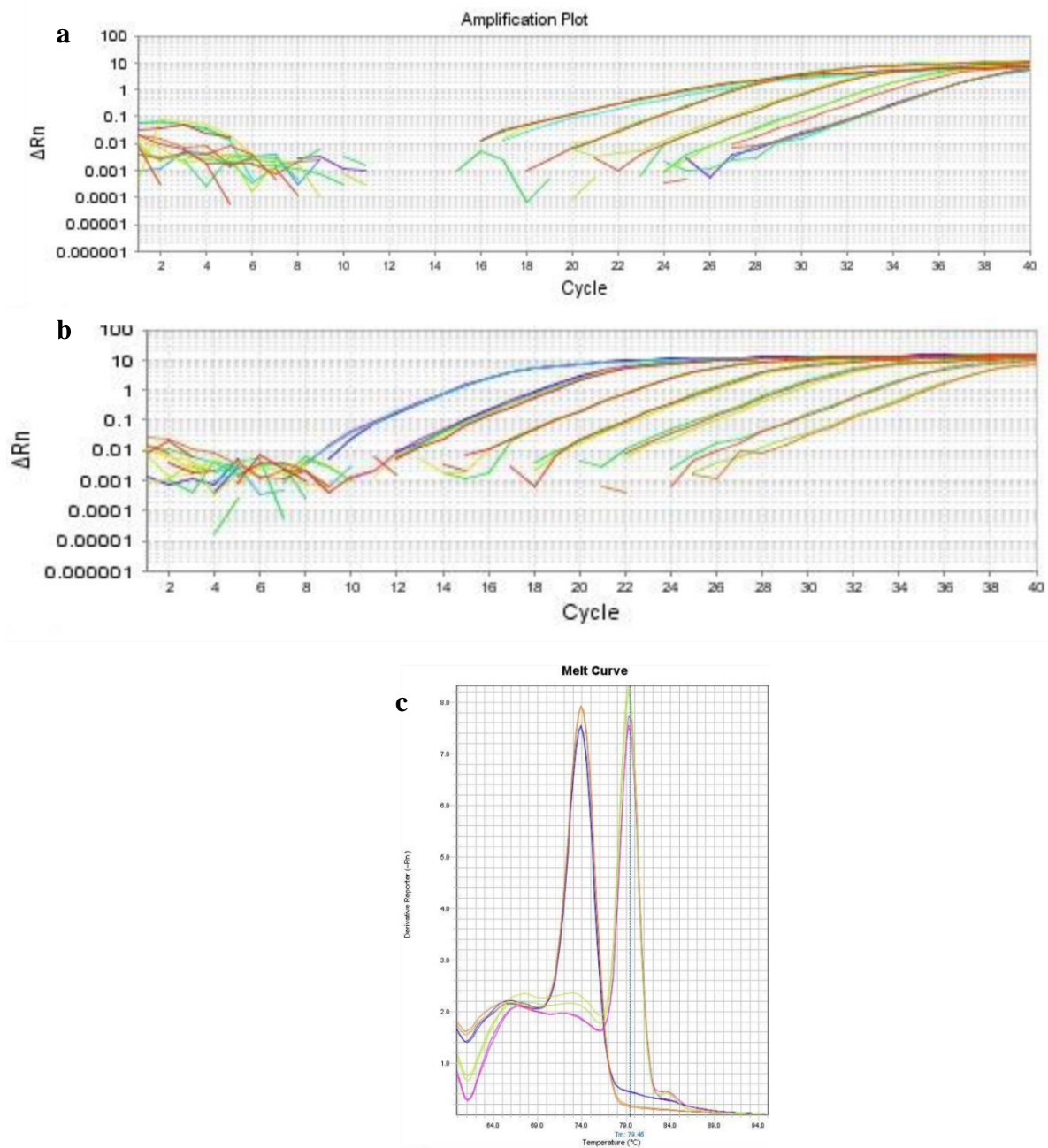
#### **4.4.2. PCR quantitativa em tempo real com iniciadores para *ssrRNA* para diagnóstico e determinação na carga parasitária**

##### **4.4.2.1. Padronização dos Ensaios de Quantificação Parasitária por qPCR**

A fim de quantificar a carga parasitária por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foram utilizados genes direcionados para amplificação da subunidade 18S do rRNA de *Leishmania* sp. (*ssrRNA*) e um direcionado para amplificação do gene constitutivo de cão hipoxantina fosforibosiltransferase (HPRT). Os ensaios foram padronizados e as curvas padrão para a quantificação foram definidas com coeficientes de variação (R2) de 0,966 e 0,943, respectivamente (**Figura 4.14a e b**). A curva padrão para o gene HPRT compreendeu seis pontos de diluição seriada e para o gene *ssrRNA* oito pontos (**Figuras 4.14a e b; 4.15a e b**). As temperaturas da curva de dissociação foram 74,0°C e 79,0°C para os genes HPRT e *ssrRNA*, respectivamente (**Figura 4.15c**).



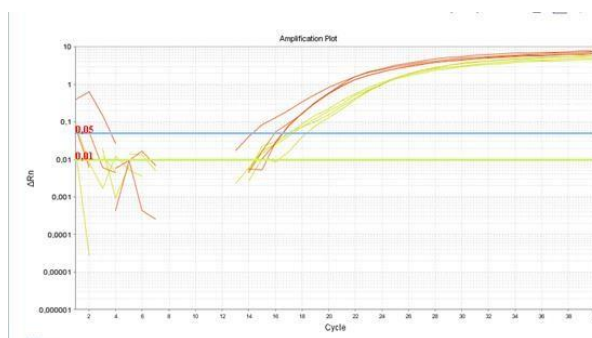
**Figura 4.14.** Curvas padrão utilizadas como referência para a quantificação parasitária em amostras de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. (a) Curva construída com diluição seriada de DNA de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de cão para o gene HPRT. (b) Curva construída com diluição seriada de DNA de *L. infantum* para o gene ssrRNA de *Leishmania* sp. Ct (*cycle threshold*): número de ciclos de PCR em que é detectada a máxima fluorescência.



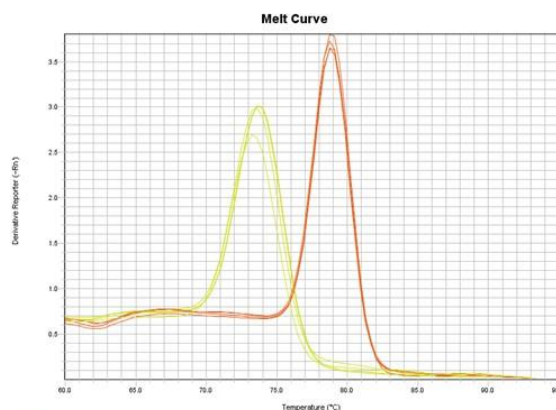
**Figura 4.15.** Curvas padrão no ensaio de PCR em tempo real. (a) Gráfico de amplificação de 5 diluições seriadas do DNA de células caninas para o gene HPRT; (b) Gráfico de amplificação de 7 diluições seriadas do DNA de promastigotas de *L. infantum* para o gene ssrRNA; (c) Picos da curva de dissociação para o amplicon de HPRT (74,0°C) e para o amplicon de ssrRNA (79,0°C).

#### 4.4.2.2. Diagnóstico e carga parasitária de aspirado de linfonodo e sangue de cães com baixo escore clínico para Leishmaniose Visceral Canina

Para esta análise, foi utilizado o DNA extraído a partir do aspirado de linfonodo armazenado em RNA Later® e sangue total congelado. Os iniciadores para *ssrRNA* de *Leishmania* e *HPRT* foram utilizados para diagnóstico e para determinar a carga parasitária (**Figura 4.16 e 4.17**). O cálculo da carga parasitária foi realizado mediante a utilização de curvas padrão com diluição seriada do DNA de promastigotas de *Leishmania* e de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de cão já padronizadas no laboratório. Da mesma forma que na qPCR com iniciador para *kDNA*, as 14 amostras de aspirado de linfonodo que não apresentaram amplificação para *HPRT* foram desconsideradas, pois se tratavam de amostras falso negativas. Dessa forma, 25% (33/132) das amostras foram positivas. A carga parasitária variou de  $9,604 \times 10^4$  a  $1,165 \times 10^6$  parasitas/ $10^6$  células do hospedeiro (**Tabela 4.9**). Dos animais positivos, 21/33 eram assintomáticos (escore clínico=0).



**Figura 4.16.** Curva de amplificação obtida na qPCR com os iniciadores *ssrRNA* (vermelho) e *HPRT* (amarelo).



**Figura 4.17.** Curva de dissociação dos produtos obtidos na qPCR com os iniciadores *HPRT* (74.0°C) e *ssrRNA* (79.0°C).

**Tabela 4.9.** Carga parasitária obtida a partir da análise do aspirado de linfonodo com o iniciador ssrRNA.

<b>Animal</b>	<b>Carga Parasitária (Parasitas/10<sup>6</sup> células do hospedeiro)</b>
LPL-D076	96,04116
LPL-D021	145,5824
LPL-D119	201,1943
LPL-D115	259,723
LPL-D083	272,8686
LPL-D003	418,4796
LPL-D067	450,0695
LPL-D039	608,5136
LPL-D125	674,4976
LPL-D019	808,0439
LPL-D143	827,3113
LPL-D023	883,0746
LPL-D113	974,5721
LPL-D049	2166,327
LPL-D008	2811,978
LPL-D130	2994,046
LPL-D040	3665,378
LPL-D035	3674,402
LPL-D060	4322,422
LPL-D118	4538,686
LPL-D132	8397,223
LPL-D131	1.0112,32
LPL-D122	1.1044,63
LPL-D059	6.6445,18
LPL-D053	8.6330,35
LPL-D070	1.28163,3
LPL-D026	13.2880,2
LPL-D123	13.4491,6
LPL-D107	24.6227,8
LPL-D006	35.2018,7
LPL-D147	70.7860,2
LPL-D005	114.8381,0
LPL-D106	116.5031,0

Utilizando o DNA extraído a partir do sangue total congelado, todas as amostras apresentaram amplificação satisfatória para o iniciador HPRT. Entretanto apenas 2,7% (4/146) dos cães foram positivos. As cargas parasitárias variaram de  $1,82 \times 10^2$  a  $1,04 \times 10^3$  parasitas/10<sup>5</sup> células do hospedeiro (**Tabela 4.10**). Apenas um dos quatro animais (LPL-D014) não apresentava nenhum sinal clínico de LVC.

**Tabela 4.10.** Carga parasitária obtida a partir da análise do sangue total com o iniciador *ssrRNA*.

<b>Animal</b>	<b>Carga Parasitária (Parasitas/10<sup>6</sup> células do hospedeiro)</b>
LPL-D026	182,15
LPL-D014	290
LPL-D005	430
LPL-D006	1040

Obtiveram-se três animais que foram positivos para ambas as amostras analisadas (sangue e linfonodo). Embora o animal LPL-D014 tenha sido positivo na amostra de sangue total, a amostra de aspirado de linfonodo não apresentou amplificação com o iniciador HPRT. Uma explicação para esse fato pode ter sido o pequeno porte do animal da raça Pinscher que apresentava o linfonodo de tamanho reduzido, o que provavelmente comprometeu a qualidade da coleta da amostra. Por esse motivo, o porte do animal pode ser um ponto crítico da coleta do aspirado de linfonodo.

#### **4.5. RPA-LF como método de diagnóstico rápido e aplicável aos postos de atendimento**

Na análise dos resultados obtidos com RPA-LF, somente as amostras que apresentaram amplificação para o HPRT foram incluídas. Entretanto três amostras das 14 que não apresentaram amplificação pelo HPRT foram positivas no RPA-LF de linfonodo. Isso, porque a amostra recolhida para o papel de filtro era a primeira a ser recolhida e por isso pode ter sido privilegiada no momento da coleta.

Após desconsiderar as amostras sem amplificação do gene HPRT, um total de 132 amostras de linfonodos foram avaliadas. Utilizando o primeiro protocolo, com menor concentração de iniciadores e menor volume de DNA, um total de 47/132 foram positivas. Utilizando o protocolo aprimorado, com maior concentração de iniciadores e maior volume de DNA, obtivemos 55/132 amostras positivas, representando um aumento de 6% (8 animais) na positividade. Dessa forma, para as comparações, serão utilizados os dados do protocolo otimizado.

As 55 amostras positivas foram classificadas em uma escala de intensidade de banda a partir da leitura visual, assim: 18 (32,7%) foram fortemente positivas, 19 (34,5%) moderadamente positivas e 18 (32,7%) fracamente positivas.

Como houve três amostras positivas na qPCR com iniciador *ssrRNA* e negativas no RPA-LF, o RPA-LF foi repetido visando confirmar esse resultado. Uma nova extração do papel de filtro foi realizada assim como os DNA extraído com kit a partir do frasco de RNA Later®, o mesmo utilizado na qPCR, foram utilizados no reteste. Entretanto, não houve alteração nos resultados, com esses animais permanecendo com resultados discordantes.

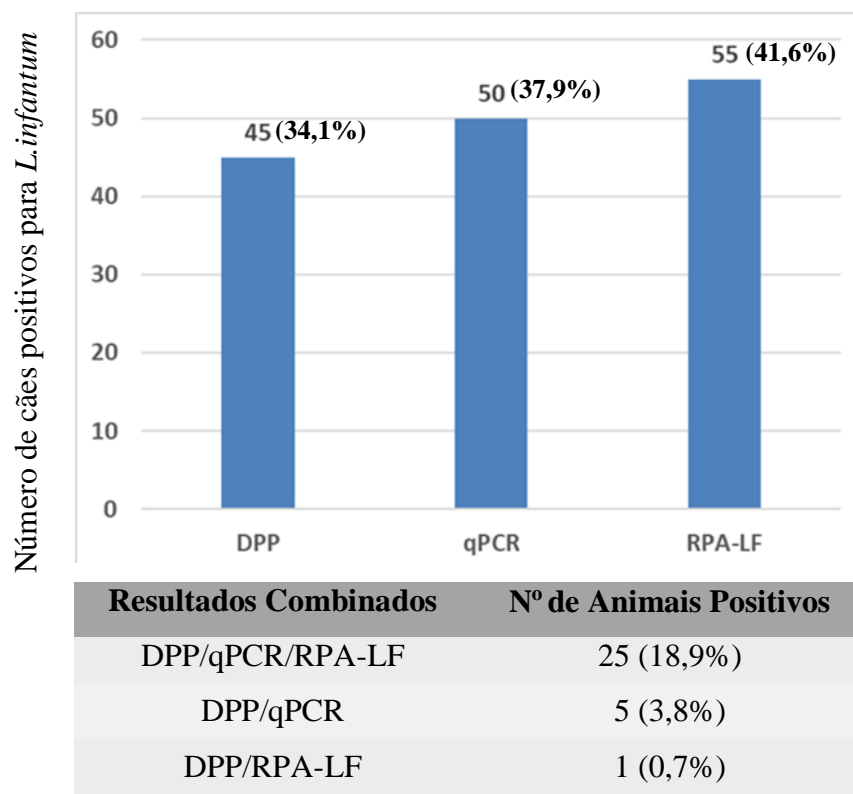
Apenas os 64 animais da primeira coleta (dezembro de 2016) do Grupo 1 (n=146) tiveram suas amostras de sangue analisadas na RPA-LF, destes 4/64 (6,25%) animais foram positivos. Utilizando a mesma escala de intensidade de banda, foram classificados em: três fortemente positivos (LPL-D005, LPL-D006), um moderadamente positivo (LPL-D014) e um fracamente positivo (LPL-D026). O animal LPL-D014, não foi considerado na avaliação de linfonodo, uma vez que não apresentou amplificação do *HPRT* em linfonodo, enfatizando a importância de uma coleta de material de qualidade para que não haja animais falso negativos por problema amostral. Como na primeira coleta, os resultados obtidos com amostras de sangue total ficaram aquém dos obtidos com aspirado de linfonodo, as amostras de aspirado de linfonodo foram selecionadas para as posteriores análises.

Dos 64 animais da primeira coleta (janeiro de 2016) que tiveram amostras de sangue e aspirado de linfonodo avaliadas, 19 foram positivos na RPA-LF, sendo três deles positivos em ambas as amostras, 16 foram positivos apenas para o material extraído de linfonodo e um deles apenas para o sangue.

Do total de cães positivos na RPA-LF utilizando amostras de aspirado de linfonodo (N=55), 37/55 (67,27%) eram assintomáticos (escore clínico=0) e 18/55 (32,72%) apresentavam escore clínico igual a um.

#### **4.6. Aplicabilidade do teste RPA-LF como teste parasitológico de fácil execução e complementar ao DPP®LVC**

Por se tratar de um teste que necessita de poucos recursos para sua utilização, necessitando apenas de uma centrífuga e um banho a seco, a RPA-LF pode ser uma alternativa de teste parasitológico (molecular) rápido e de fácil execução. Para avaliar essa aplicabilidade do teste RPA-LF, foi realizada a comparação dos resultados obtidos no RPA-LF com os outros testes utilizados no estudo nos 132 animais avaliados (**Figura 4.18**).



**Figura 4.18.** Distribuição dos animais positivos em cada teste realizado (acima). Quantidade de animais positivos em mais de um teste (abaixo).

A RPA-LF foi comparada com os outros testes moleculares parasitológicos aplicados, as qPCR com o iniciador para kDNA (**Tabela 4.11**) e *ssrRNA* (**Tabela 4.12**). Observamos uma boa associação entre a RPA-LF, principalmente com a qPCR com o iniciador para *ssrRNA*. Quando utilizamos os resultados de ambas as qPCR combinadas (**Tabela 4.13**), a RPA-LF deixou de detectar apenas 13/50 (26%) dos cães positivos na qPCR. Entretanto, 18/82 (21,9%) animais que foram negativos na qPCR, positivaram na RPA-LF.

**Tabela 4.11.** Relação entre positividade no teste qPCR com iniciador para *ssrRNA* e RPA-LF

Dados analisados*	RPA-LF +	RPA-LF -	Total
<i>ssrRNA</i> +	30 (22,7%)	3 (2,3%)	33 (25,0%)
<i>ssrRNA</i> -	25 (18,9%)	74 (56,0%)	99 (75,0%)
<b>Total</b>	55 (41,6%)	77(58,3%)	132 (100%)

\*Frequências de animais positivos e negativos para o qPCR e RPA-LF em números absolutos (percentual).



**Tabela 4.12.** Relação entre positividade no teste qPCR com iniciador para kDNA e RPA-LF

<b>Dados analisados*</b>	<b>RPA-LF +</b>	<b>RPA-LF -</b>	<b>Total</b>
<b>kDNA+</b>	34 (25,7%)	11 (8,3%)	45(34,1%)
<b>kDNA-</b>	21 (15,9%)	66 (50,0%)	87(69,9%)
<b>Total</b>	55 (41,6%)	77(58,3%)	132 (100%)

\*Frequências de animais positivos e negativos para o qPCR e RPA-LF em números absolutos (percentual).

**Tabela 4.13.** Relação entre positividade em pelo menos um dos testes de qPCR e RPA-LF

<b>Dados analisados*</b>	<b>RPA-LF +</b>	<b>RPA-LF -</b>	<b>Total</b>
<b>qPCR+</b>	37 (28,0%)	13 (9,8%)	50(37,9%)
<b>qPCR-</b>	18 (13,6%)	64 (48,5%)	82(62,1%)
<b>Total</b>	55 (41,6%)	77(58,3%)	132 (100%)

\*Frequências de animais positivos e negativos para o qPCR e RPA-LF em números absolutos (percentual).

De forma a checar a complementariedade da RPA-LF com os resultados obtidos no teste sorológico rápido (DPP®LVC), foi realizada a comparação entre estes dois testes. Nota-se que 27/55 (49,1%) dos animais positivos na RPA-LF não foram positivos no DPP®LVC, o que pode indicar infecções recentes onde os animais ainda não apresentaram soroconversão (**Tabela 4.14**). Enquanto a presença de 17/42 (40,5%) animais DPP®LVC positivos e RPA-LF negativos sugerem a presença de animais expostos ao parasito, mas não infectados, ou cães com carga parasitária baixa, incapazes de serem detectados pelo teste molecular (**Tabela 4.14**).

**Tabela 4.14.** Relação entre positividade em pelo menos um dos testes de DPP e RPA-LF

<b>Dados analisados*</b>	<b>RPA-LF +</b>	<b>RPA-LF -</b>	<b>Total</b>
<b>DPP+</b>	28(21,2%)	17(12,9%)	45(34,1%)
<b>DPP-</b>	27 (20,4%)	60(45,4%)	87(65,9%)
<b>Total</b>	55(41,6%)	77(58,3%)	146 (100%)

\*Frequências de animais positivos e negativos para o qPCR e RPA-LF em números absolutos (percentual).

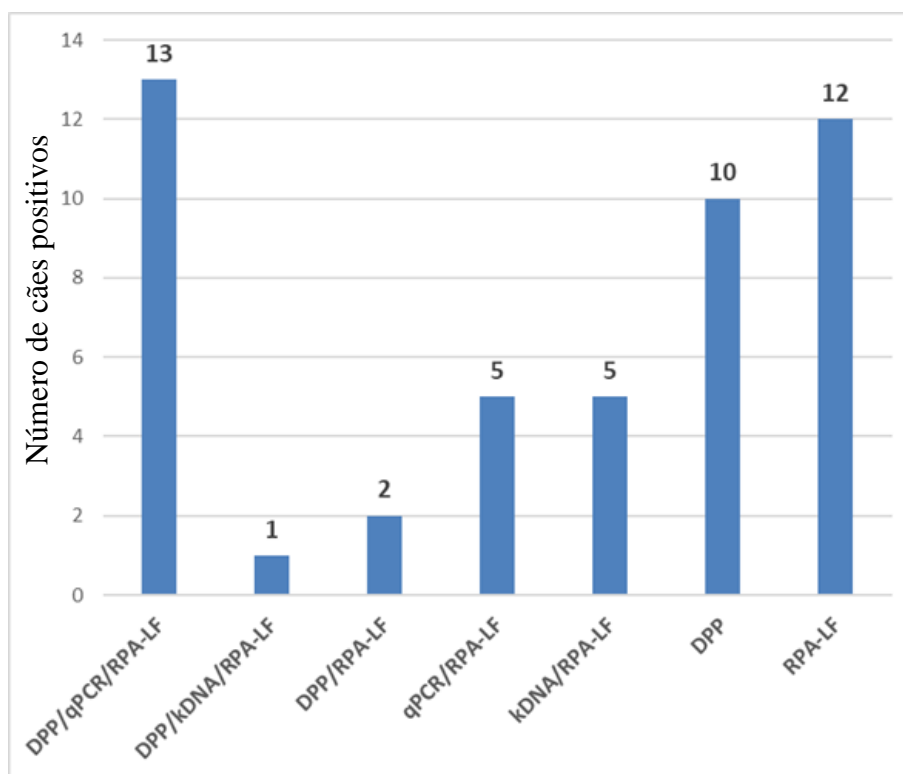
Os resultados do RPA-LF foram incorporados associados ao conceito da classificação dos animais em faixas de índice de reatividade (**Tabela 4.15**). Houve uma associação significativa entre esses resultados ( $p < 0,0001$ ). Ressalta-se que todos os animais com  $IR \geq 1,0$  e a maioria dos cães com  $0,5 \leq IR < 1,0$  (13/14 – 92,8%) foram detectados pela RPA-LF. Em contrapartida, 34/106 (32%) dos animais dos animais com  $IR < 0,2$  foram positivos na RPA-LF, o que pode sugerir uma detecção mais precoce de animais recém-infectados.

**Tabela 4.15.** Associação entre as faixas de IR e positividade no teste molecular

	<b>IR &lt; 0,2</b>	<b>0,2 ≤ IR &lt; 0,5</b>	<b>0,5 ≤ IR &lt; 1,0</b>	<b>IR ≥ 1,0</b>	<b>Total</b>
<b>RPA-LF +</b>	34	5	14	3	55
<b>RPA-LF -</b>	72	4	1	0	77
<b>Total</b>	106	9	14	3	132

#### **4.7. Acompanhamento de cães assintomáticos residentes em área endêmica para Leishmaniose Visceral Canina**

Para esta segunda fase do estudo, foram selecionados os animais oriundos do bairro de Santa Helena, Governador Valadares (n=82), que foram positivos para pelo menos um dos testes aplicados na visita realizada em Janeiro de 2018. Destes, um total de 48/82 (58,53%) animais foram positivos para pelo menos um dos testes (DPP®LVC, RPA-LF e qPCR com iniciadores para kDNA e ssrRNA). Na **Figura 4.19** está representado a distribuição desses animais em relação à positividade de cada teste.



**Figura 4.19.** Distribuição dos animais positivos para pelo menos um dos testes utilizados. Os grupos de animais qPCR positivos, correspondem aqueles que apresentaram amplificação na PCR em tempo real com os iniciadores com alvo para *ssrRNA* e *kDNA*. Já os *kDNA* positivos, apresentaram amplificação apenas na PCR em tempo real com iniciadores para regiões do *kDNA*. Não houve casos de animais positivos apenas na PCR em tempo real utilizando iniciadores direcionados para *ssrRNA*.

Uma vez identificados, foi realizado retorno a residência desses animais após três meses (abril de 2018). Entretanto, dos 48 animais buscados, somente 32 foram encontrados. A perda de animais no estudo ocorreu por óbito ou mudança de endereço dos responsáveis dos animais. A perda por óbito ocorreu somente no grupo de animais positivos em todos os testes realizados, em um total de 4/13 (30,77%) animais (LPL-D067, LPL-D107, LPL-D122 e LPL-D123). Uma tabela com os resultados de todos os testes realizados nos cães que foram acompanhados se encontra no **Anexo IV**.

Os animais foram então divididos em grupos de acordo com a positividade para cada teste na primeira visita (janeiro de 2018), quatro grupos foram formados com animais positivos para pelo menos um dos testes (**Quadros 4.2 a 4.4**) e um quarto grupo com os animais negativos (**Quadro 4.5**). Os animais que evoluíram a óbito entre a segunda visita (abril de 2018) e a terceira visita (agosto de 2018) estão assinalados nos quadros (**Quadros 4.2 a 4.5**).

**Quadro 4.2.** Grupo A – animais residentes no bairro de Santa Helena , Governador Valadares, positivos para *L infantum* todos os testes realizados em janeiro de 2018 (n=5)

ANIMAL	Score Clínico	DPP®LVC	Carga Parasitária Parasitas/10 <sup>3</sup>	qPCR kDNA	RPA -LF
LPL-D076	1	Pos	0,096	Pos	++
LPL-D113*	0	Pos	0,975	Pos	+
LPL-D118*	1	Pos	4,539	Pos	+
LPL-D132*	0	Pos	8,397	Pos	+
LPL-D143	0	Pos	0,827	Pos	++

\*: Animais que evoluíram a óbito após a segunda visita; Pos: positivo; +: positivo fraco; ++: positivo moderado; cinza: teste no qual animal foi positivo

**Quadro 4.3.** Grupo B – animais residentes no bairro de Santa Helena , Governador Valadares, positivos para *L infantum* apenas no DPP®LVC realizado em janeiro de 2018 (n=8)

ANIMAL	Score Clínico	DPP®LVC	Carga Parasitária Parasitas/10 <sup>3</sup> células hospedeiras	qPCR kDNA	RPA -LF
LPL-D082	0	Pos	Neg	Neg	Neg
LPL-D084	0	Pos	Neg	Neg	Neg
LPL-D089	0	Pos	Neg	Neg	Neg
LPL-D109	0	Pos	Neg	Neg	Neg
LPL-D114	1	Pos	Neg	Neg	Neg
LPL-D121*	0	Pos	Neg	Neg	Neg
LPL-D124	0	Pos	Neg	Neg	Neg
LPL-D139	0	Pos	Neg	Neg	Neg

\*: Animais que evoluíram a óbito após a segunda visita; Pos: positivo; Neg: negativo; cinza: teste no qual animal foi positivo

**Quadro 4.4.** Grupo C – animais residentes no bairro de Santa Helena , Governador Valadares, positivos para *L infantum* no RPA-LF realizado em janeiro de 2018 (n=19)

ANIMAL	Score Clínico	DPP@LVC	Carga Parasitária Parasitas/10 <sup>3</sup> células hospedeiras	qPCR kDNA	RPA -LF
LPL-D068	0	Pos	Neg	Pos	+++
LPL-D093	1	Pos	Neg	Pos	++
LPL-D069	0	Pos	Neg	Neg	+++
LPL-D083	0	Neg	0,273	Pos	+++
LPL-D115	1	Neg	0,260	Pos	++
LPL-D119	0	Neg	0,201	Pos	++
LPL-D125	0	Neg	0,674	Pos	++
LPL-D130*	0	Neg	2,994	Pos	+++
LPL-D091	0	Neg	Neg	Pos	++
LPL-D103	0	Neg	Neg	Pos	+
LPL-D105*	1	Neg	Neg	Pos	+
LPL-D071	0	Neg	Neg	Neg	+
LPL-D075	0	Neg	Neg	Neg	+
LPL-D081	0	Neg	Neg	Neg	++
LPL-D085	0	Neg	Neg	Neg	+
LPL-D090	0	Neg	Neg	Neg	+
LPL-D095*	0	Neg	Neg	Neg	+
LPL-D096*	0	Neg	Neg	Neg	+++
LPL-D140	1	Neg	Neg	Neg	+

\*: Animais que evoluíram a óbito após a segunda visita; Pos: positivo; Neg: negativo; +: positivo fraco; ++: positivo moderado; +++: positivo forte; cinza: teste no qual animal foi positivo

**Quadro 4.5.** Grupo D– animais residentes no bairro de Santa Helena , Governador Valadares, negativos para *L infantum* negativos em todos os testes realizados em janeiro de 2018 (n=8)

ANIMAL	Escore Clínico	DPP®LVC	Carga Parasitária Parasitas/10 <sup>3</sup> células hospedeiras	qPCR kDNA	RPA -LF
LPL-D110	0	Neg	Neg	Neg	Neg
LPL-D116*	0	Neg	Neg	Neg	Neg
LPL-D117	0	Neg	Neg	Neg	Neg
LPL-D120	0	Neg	Neg	Neg	Neg
LPL-D134*	0	Neg	Neg	Neg	Neg
LPL-D136	1	Neg	Neg	Neg	Neg
LPL-D137*	1	Neg	Neg	Neg	Neg
LPL-D138*	0	Neg	Neg	Neg	Neg

\*: Animais que evoluíram a óbito após a segunda visita; Neg: negativo ; cinza: teste no qual animal foi positivo

Alguns animais apresentaram alteração no score clínico, sendo os sinais clínicos observados em ambas as visitas: dermatite (segunda visita – abril de 2018: 12/40, terceira visita – agosto de 2018:1/28) , alopecia (segunda visita – abril de 2018:4/40, terceira visita – agosto de 2018: 4/28) e linfadenopatia (segunda visita– abril de 2018: 2/40, terceira visita – agosto de 2018: 1/28) (**Anexo IV**). A **Figura 4.20** são exemplos de manifestações clínicas observadas nos cães.



**Figura 4.20.** Manifestações clínicas observadas em cães acompanhados de janeiro a agosto de 2018 positivos para LVC residentes no bairro de Santa Helena, Governador Valadares. **a.** Dermatite ulcerativa em focinho; **b.** Alopecia; **c.** e **d.** Dermatite ulcerativa em ponta de orelha; **e.** Dermatite ulcerativa em lábio superior; **f.** linfonodomegalia. Imagens do arquivo pessoal.

#### **4.7.1. Comparação dos resultados obtidos nos diferentes testes diagnósticos realizados durante o período de acompanhamento dos cães**

O DPP foi repetido em todos os animais, tanto na segunda (abril de 2018), como na terceira visita (agosto de 2018). Avaliando a segunda visita (abril de 2018), os resultados foram concordantes em 36/40(90%) testes realizados. Entre os cinco resultados discordantes, três animais se tornaram positivos (LPL-D081, LPL-D083 e LPL-D117) e dois se tornaram negativos (LPL-D082 e LPL-D121). O animal LPL-D081 já apresentava o RPA-LF moderadamente positivo na primeira avaliação (janeiro de 2018), com ambas as qPCR e DPP®LVC negativos. Já o cão LPL-D083 possuía qPCR com iniciador para kDNA positivo e RPA-LF fortemente positivo. O animal (LPL-D117) pertencia ao grupo D, grupo dos cães negativos, entretanto residia junto com um animal (LPL-D118) do grupo A (positivo para todos os testes realizados). Já os animais que negativaram (LPL-D082 e LPL-D121) pertenciam ao grupo B, de animais positivos apenas no DPP®LVC (**Anexo IV**).

Analisando o resultado do DPP na terceira visita (agosto de 2018), 24/28 (85,7%) animais apresentaram resultados concordantes com o encontrado na avaliação anterior (abril de

2018). Entre os discordantes, três animais negativos positivaram (LPL-D082, LPL-D120 e LPL-125), dentre os quais, apenas o animal LPL-D082 apresentou resultado de DPP®LVC positivo na primeira avaliação (janeiro de 2018). Neste cão, o resultado positivo no DPP®LVC da terceira avaliação (agosto de 2018), veio acompanhado de surgimento de carga parasitária. O animal LPL-D120 pertencia ao grupo D, dos animais previamente negativos (janeiro de 2018). Enquanto o animal LPL-D125, se encontrava positivo para os testes moleculares na primeira avaliação (janeiro de 2018), indicando uma possível soroconversão. Um cão negativou (LPL-D083), o qual foi positivo no DPP®LVC apenas na segunda avaliação (abril de 2018), mantendo os resultados dos testes moleculares positivos, podendo sugerir uma imunossupressão causada pela LVC (**Anexo IV**).

Os animais também foram acompanhados quanto ao surgimento de carga parasitária detectável e sua variação ao longo do período. Em relação ao Grupo A, os animais que apresentavam maiores cargas parasitárias evoluíram a óbito antes da segunda visita (abril de 2018). Um dos animais (LPL-D076) que apresentava carga parasitária bastante baixa na primeira visita (janeiro de 2018) ( $0,096$  parasitos /  $10^3$  células de cão), não apresentou carga parasitária detectável nas outras duas visitas (abril e agosto de 2018), embora o DPP®LVC permanecesse positivo, indicando um possível contato com o parasito, sem desenvolvimento de doença. Outros três animais evoluíram a óbito (LPL-D113, LPL-D118 e LPL-D132), sendo que apenas um deles apresentou aumento significativo de carga parasitária (LPL-D113). O cão LPL-D143 permaneceu vivo até a terceira visita (agosto de 2018), e apresentou uma flutuação na carga parasitária (**Anexo IV**).

No Grupo B, três (LPL-D082, LPL-D109 e LPL-D139) dos oito cães foram positivos na qPCR na terceira visita (agosto de 2018). O animal pertencente a este grupo que evoluiu a óbito (LPL-D121) após a segunda visita (abril de 2018) não apresentou carga parasitária detectável em seu linfonodo nas duas avaliações realizadas (janeiro e abril de 2018) (**Anexo IV**).

Os resultados obtidos nos animais do Grupo C foram bastante variáveis, com o cão LPL-D069, apresentando amplificação do DNA do parasita na qPCR na segunda visita (abril de 2018). Enquanto os cães LPL-D068, LPL-D081 e LPL-D093, só passaram a apresentar carga parasitária detectável na terceira visita (agosto de 2018) (**Anexo IV**). Entre os cinco animais que foram positivos na primeira visita (janeiro de 2018) nos três testes moleculares realizados, foi observado flutuação na carga parasitária, com o cão LPL-D083 apresentando qPCR positivo nas três visitas. O cão LPL-D130 apresentou carga detectável nas duas primeiras visitas (janeiro e abril de 2018), evoluindo a óbito antes da terceira avaliação (agosto de 2018). Os outros três



animais (LPL-D115, LPL-D119 e LPL-D125), apresentaram carga parasitária detectável na primeira visita (janeiro de 2018), passando para indetectável na segunda avaliação (abril de 2018), com apenas o cão LPL-D119 retornando a uma carga parasitária detectável na terceira visita (agosto de 2018) (**Anexo IV**). Dez cães permaneceram com carga parasitária indetectável durante o período do estudo (**Anexo IV**).

No Grupo D, dos animais negativos na primeira avaliação (janeiro de 2018), o cão LPL-D110 passou a apresentar carga parasitária detectável na segunda avaliação (abril de 2018) (0,462 parasitos /  $10^3$  células de cão) com aumento na terceira avaliação (agosto de 2018) (1,745 parasitos /  $10^3$  células de cão). O animal LPL-D117 somente apresentou detecção do DNA do parasita no linfonodo na terceira visita (agosto de 2018) (0,068 parasitos /  $10^3$  células de cão). Os demais se mantiveram com carga parasitária indetectável pela amplificação com iniciadores para *ssrRNA* (**Anexo IV**).

O teste RPA-LF foi o outro teste realizado durante o acompanhamento dos animais, visando sua aplicação no acompanhamento dos animais como candidato a teste parasitológico, uma vez que o qPCR tem realização inviável nos centros municipais de diagnóstico. Para isso, estabelecemos a relação entre a positividade desses dois testes, primeiramente com os resultados obtidos na segunda visita (abril de 2018) (**Tabela 4.16**). Podemos observar que todos os animais positivos (N=8) na qPCR foram também positivos no teste RPA-LF. Animais positivos na RPA-LF e negativos na qPCR (N=19) ocorreram, provavelmente pelos iniciadores de ambas as técnicas estarem direcionadas a regiões diferentes, uma vez que o qPCR utiliza a região de *ssrRNA* e o RPA-LF a região de *kDNA* (**Tabela 4.16**).

**Tabela 4.16.** Relação entre positividade para *L. infantum* no teste qPCR com iniciador para *ssrRNA* e RPA-LF nas amostras coletadas de cães do bairro de Santa Helena, Governador Valadares na segunda visita (abril de 2018) (n=40)

Dados analisados*	RPA-LF +	RPA-LF -	Total
qPCR+	8 (20%)	0 (0%)	8 (20%)
qPCR-	19 (47,5%)	13 (32,5%)	32 (80%)
<b>Total</b>	27 (67,5%)	13(32,5%)	40 (100%)

\*Frequências de animais positivos e negativos para o qPCR e RPA-LF em números absolutos (percentual).

A mesma análise foi realizada com os resultados obtidos na terceira avaliação (**Tabela 4.17**). Foram avaliados apenas 26 animais, uma vez que 12/40 (30%) dos animais evoluíram a óbito e dois animais não apresentaram amplificação na qPCR para o iniciador HPRT, sendo excluído.

**Tabela 4.17.** Relação entre positividade para *L. infantum* no teste qPCR com iniciador para ssrRNA e RPA-LF nas amostras coletadas de cães do bairro de Santa Helena, Governador Valadares na terceira visita (agosto de 2018) (n=26)

	RPA-LF +	RPA-LF -	Total
<b>Dados analisados*</b>			
<b>qPCR+</b>	5 (19,2%)	7 (26,9%)	12 (46,1%)
<b>qPCR-</b>	4 (15,4%)	10 (38,4%)	14 (53,8%)
<b>Total</b>	9 (34,6%)	17 (65,4%)	26(100%)

\*Frequências de animais positivos e negativos para o qPCR e RPA-LF em números absolutos (percentual)..

O resultado também foi avaliado de acordo com a intensidade da banda teste obtida no RPA-LF a partir da leitura visual, sendo o mesmo muito variável. Tal fato pode ocorrer em função da quantidade de material obtido por coleta, ou mesmo eficiência da extração, uma vez que para este teste não existe um normalizador, tal qual a amplificação com iniciador para HPRT utilizada no cálculo da carga parasitária. A positividade e intensidade de banda teste para cada animal está demonstrada no **Anexo III**. Não foi observada relação entre a intensidade da banda e agravamento dos sinais clínicos e/ou óbito.

#### **4.8. Avaliação da Capacidade de Infectar o Vetor**

O xenodiagnóstico foi realizado na segunda (abril de 2018) e terceira visita (agosto de 2018) aos animais. Após o primeiro xenodiagnóstico (abril de 2018), todos os 40 animais receberam coleiras impregnadas com deltametrina. Na terceira visita (agosto de 2018), foi observado que 17/28 (60,7%) dos cães haviam perdido a coleira. Cinco animais estavam com a coleira no momento do xenodiagnóstico, enquanto quatro cães tiveram suas coleiras removidas uma semana antes do teste. Dois responsáveis pelo animal não autorizaram a realização do xenodiagnóstico na terceira visita em agosto de 2018, mas foi observado que ambos os cães estavam com a coleira repelente (**Anexo IV**).

A presença da coleira repelente ou retirada recente interferiu fortemente na realização do segundo xenodiagnóstico. Entretanto essa medida de controle se fez essencial, visando a segurança dos responsáveis pelos animais que mantinham os mesmos em seu domicílio.

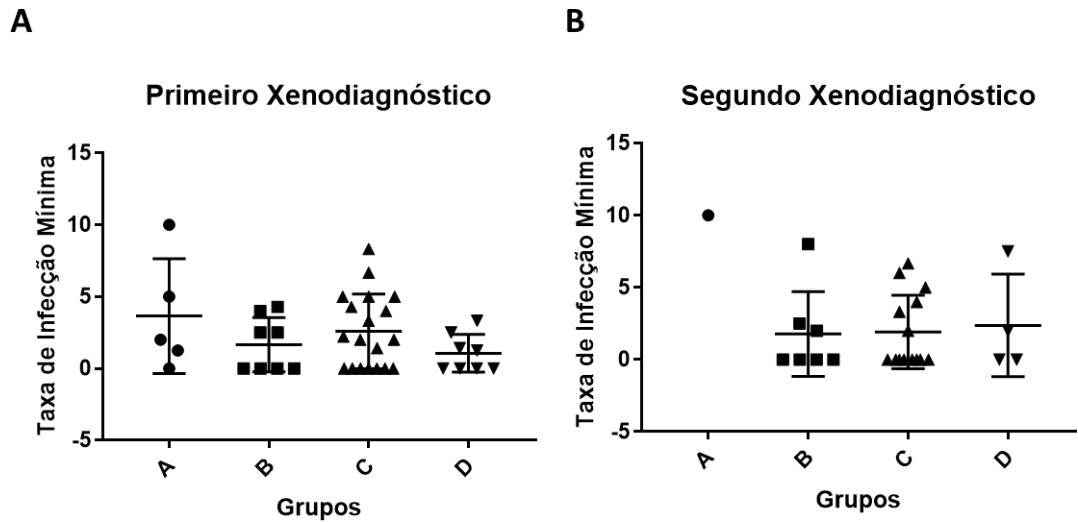
As taxas de infecção mínima variaram de 1,25% a 10% e 2% a 10%, no primeiro (abril de 2018) e segundo xenodiagnóstico (agosto de 2018), respectivamente. Embora as médias dos grupos A e C sejam maiores, não houve diferença estatística (**Tabela 4.18 e Figura 4.21a**). O segundo teste (agosto de 2018) foi prejudicado em função do óbito de animais e não autorização do xenodiagnóstico, reduzindo o número de animais avaliados para 26 cães, também não sendo observado diferença significativa (**Tabela 4.18 e Figura 4.21b**). Logo, o fato de ter um teste positivo, já ressalta a necessidade desse animal receber a coleira repelente.

Não foi observado correlação entre a presença de sintomas e positividade no xenodiagnóstico, indicando a importância dos animais assintomáticos no ciclo de transmissão da LVC. O escore clínico de cada animal no momento da realização do xenodiagnóstico está detalhado no **Anexo IV**.

**Tabela 4.18.** Média e desvio padrão das taxas de infecção mínima de flebotomíneos obtidas nos dois xenodiagnósticos.

Grupo	1º Xenodiagnóstico		2º Xenodiagnóstico	
	Nº de animais (n=40)	Média da TI (%)	Nº de animais (n=26)*	Média da TI(%)
A	4	3,65 ( $\sigma=3,99$ )	1	10 ( $\sigma=0$ )
B	8	1,66 ( $\sigma=1,88$ )	7	1,78 ( $\sigma=2,94$ )
C	19	2,59 ( $\sigma=2,59$ )	14	1,92 ( $\sigma=2,55$ )
D	8	1,06 ( $\sigma=1,30$ )	4	2,37 ( $\sigma=3,54$ )

\* A redução do número de animais no segundo xenodiagnóstico ocorreu devido ao óbito dos animais e dois responsáveis não autorizaram o procedimento



**Figura 4.21.** Distribuição das taxas de infecção mínima para o vetor em relação aos grupos de estudo. As barras indicam a média e desvio padrão de cada grupo.

Observou-se que os dois animais pertencentes ao Grupo A, LPL-D132 e LPL-D143, foram os únicos com a TI mais elevada (10%), porém em momentos diferentes. O cão LPL-D132 evoluiu a óbito antes da terceira visita (agosto de 2018). O animal LPL-D143, embora positivo em todos os testes e com 10% de TI na terceira visita, permaneceu assintomático durante todo o período em que foi acompanhado (**Anexo IV**).

Alguns animais, embora apresentassem cargas parasitárias indetectáveis na amostra de linfonodo, apresentaram resultados positivos no xenodiagnóstico, sendo, assim como o inverso, também foi observado (**Anexo IV**). Nesse contexto, as três metodologias utilizadas nesse estudo (DPP®LVC, qPCR e RPA-LF) foram avaliadas como forma de melhor identificar os animais capazes de infectar os insetos vetores (**Tabela 4.19**). Nessa análise, utilizamos os resultados do primeiro xenodiagnóstico (abril de 2018). É possível observar que o RPA-LF foi o teste capaz de detectar o maior número de animais com capacidade de infectar o vetor, 17/24 (70,8%). O segundo teste, foi o DPP®LVC, identificando 11/24 (45,8%) dos animais positivos no xenodiagnóstico (**Tabela 4.19**).

**Tabela 4.19.** Relação entre a positividade nos testes diagnóstico para *L. infantum* e capacidade de infectar o vetor nos cães residentes no bairro de Santa Helena, Governador Valadares em abril de 2018.

Testes Diagnóstico	Xenodiagnóstico Positivo (n=24)	Xenodiagnóstico Negativo (n=16)
DPP+	11 (27,5%)	6 (15,0%)
DPP-	13 (32,5%)	10 (25,0%)
qPCR+	5 (12,5%)	3 (7,5%)
qPCR-	19 (47,5%)	13 (32,5%)
RPA-LF+	17 (42,5%)	10 (25,0%)
RPA-LF-	7 (17,5%)	6 (15,0%)

De posse desses dados, nota-se que quando associamos os dois testes com melhor capacidade de identificar os animais capazes de infectar o vetor, DPP<sup>®</sup>LVC e RPA-LF, a maior parte dos animais positivos no xenodiagnóstico é identificada, 21/24 (87,5%), sendo apenas 3/24 (12,5%) cães, não detectados (**Tabela 4.20**).

**Tabela 4.20.** Combinação de testes rápidos para *L. infantum* aplicados na detecção de animais positivos no xenodiagnóstico residentes no bairro de Santa Helena, Governador Valadares em abril de 2018.

Combinação de Testes	Xenodiagnóstico Positivo	Xenodiagnóstico Negativo	Total
DPP+/RPA-LF +	7 (17,5%)	5 (12,5%)	12 (30%)
DPP-/RPA-LF +	10 (25%)	5 (12,5%)	15 (37,5%)
DPP+/RPA-LF-	4 (10%)	1 (2,5%)	5 (12,5%)
DPP-/RPA-LF -	3 (7,5%)	5 (12,5%)	8 (20%)
Total	24 (60%)	16 (40%)	40 (100%)

#### **4.9. Aplicação do conceito do índice de reatividade e das faixas de reatividade no acompanhamento dos cães com baixo escore clínico em área endêmica**

Como objetivo de avaliar a aplicabilidade do cálculo da IR, a divisão em faixas de IR proposta anteriormente, associado ao RPA-LF como teste complementar, os cães acompanhados foram analisados.

Associando os resultados obtidos na segunda visita (abril de 2018), observa-se que a maior parte dos animais com  $IR \geq 0,2$  (7/8; 87,5%), apresentou positividade para RPA-LF. Nos animais com  $IR < 0,2$ , 20/32 (62,5%) foram positivos na RPA-LF (**Tabela 4.21**).

**Tabela 4.21.** Associação entre as faixas de IR e positividade para *L. infantum* na RPA-LF obtida nos cães residentes no bairro de Santa Helena, Governador Valadares em abril de 2018.

	<b>IR &lt; 0,2</b>	<b>0,2 ≤ IR &lt; 0,5</b>	<b>0,5 ≤ IR &lt; 1,0</b>	<b>IR ≥ 1,0</b>	<b>Total</b>
<b>RPA-LF +</b>	20	4	3	0	27
<b>RPA-LF -</b>	12	1	0	0	13
<b>Total</b>	32	5	3	0	40

Em relação a infectividade para o vetor, ao associando ambos os testes, ressalta-se a importância da realização da RPA-LF nos animais com  $IR < 0,2$ , pois dessa forma é possível detectar 13 animais capazes de infectar os vetores que poderiam passar despercebidos quando só realizado o teste sorológico (**Tabela 4.22**).

**Tabela 4.22.** Distribuição dos animais positivos para o xenodiagnóstico e/ou RPA-LF de acordo com as faixas de IR obtidas nos cães residentes no bairro de Santa Helena, Governador Valadares em abril de 2018..

<b>IR</b>	<b>Xenodiagnóstico Positivo (N=24)</b>		<b>Xenodiagnóstico Negativo (N=16)</b>		<b>Total</b>
	<b>RPA-LF +</b>	<b>RPA-LF -</b>	<b>RPA-LF+</b>	<b>RPA-LF-</b>	
<b>IR &lt; 0,2</b>	13	6	7	6	32
<b>0,2 &lt; IR &lt; 0,5</b>	2	1	2	0	5
<b>0,5 &lt; IR &lt; 1,0</b>	2	0	1	0	3
<b>Total</b>	17	7	10	6	40

Dos quatro cães que na segunda visita (abril de 2018) haviam evoluído a óbito todos apresentavam RPA-LF positivo. Um animal (LPL-D122) que possuía  $IR < 0,2$  evoluiu a óbito (tutores não souberam explicar a causa). As outras três mortes ocorridas foram em animais com  $IR > 0,5$  (LPL-D 067, LPL-D107, LPL-D123), tendo como causa mais provável a LVC, uma vez que demonstraram sinais clínicos como perda de peso e dermatite. Todos os quatro animais foram positivos para todos os testes realizados na primeira visita (janeiro de 2018) (**Anexo IV**).

Antes da terceira visita (agosto de 2018), 12 cães evoluíram a óbito. Dentre esses apenas o cão LPL-D132 apresentava IR elevada desde a primeira coleta (IR=0,98→0,89), possuindo carga parasitária detectável em ambas as visitas, assim como RPA-LF positivo. O cão LPL-D113, apresentou aumento do IR da primeira (janeiro de 2018) para segunda avaliação (abril de 2018) (IR=0,12→0,48), acompanhado de aumento da carga parasitária (0,975 → 17,13 parasitos/10<sup>3</sup> células de cão). O cão LPL-D118 apresentou redução na IR (IR=0,65→0,26), embora se manteve positivo na RPA-LF e com discreta variação na carga parasitária (4,54 → 3,62 parasitos/10<sup>3</sup> células de cão), acompanhado de agravamento dos sinais clínicos na segunda visita (abril de 2018). Dessa forma, a redução na IR pode estar relacionada a imunossupressão causada pela LVC. O animal LPL-D130, permaneceu sem apresentar soroconversão ao longo do período de acompanhamento com a IR=0,01 em ambos os testes, embora com RPA-LF positivo e carga parasitária detectável nos dois momentos (janeiro e abril de 2018), seu xenodiagnóstico realizado em abril de 2018 também foi positivo. Dos demais cães, todos apresentaram IR <0,2, com seis deles (LPL-D095, LPL-D096, LPL-D105, LPL-D116, LPL-D134 e LPL-D137) apresentando positividade no RPA-LF na primeira (janeiro de 2018) e/ou segunda visita (abril de 2018). O cão LPL-D121 apresentou apenas DPP positivo apenas na primeira avaliação (janeiro de 2018) (IR=0,08), já o animal LPL-D138 foi sempre negativo nos testes (**Anexo IV**).

Entre os 28 animais que foram avaliados nas três visitas, 24/28 apresentavam IR > 0,2 na primeira avaliação (janeiro de 2018), com apenas um deles (LPL-D114) alterando de faixa, para IR=0,2 na segunda avaliação (abril de 2018). Já na terceira avaliação (agosto de 2018), cinco animais (LPL-D068, LPL-D081, LPL-D089, LPL-D114 e LPL-D124) trocaram de faixa, destes 4/5 (LPL-D068, LPL-D081, LPL-D089 e LPL-D114) foram positivos na RPA-LF em pelo menos uma das avaliações. Um animal (LPL-D124) apresentou elevação na IR (0,06→0,11→0,95) embora tenha permanecido negativo para todos os demais testes realizados. Dois deles (LPL-D068 e LPL-D081), apresentaram carga parasitária detectável na última avaliação (agosto de 2018) e valores de IR de 0,43 e 0,85, respectivamente (**Anexo IV**).

Quatro animais (LPL-D069, LPL-D076, LPL-D082 e LPL-D143) apresentavam IR ≥ 0,2. O cão LPL-D069 apresentou IR elevada durante todo o período do estudo (0,92→0,84→0,88) e sempre positivo para RPA-LF. O cão LPL-D082 apresentou variação de IR ao longo do estudo (0,2→0,03→0,6), sempre negativo na RPA-LF. O aumento do IR para 0,6, veio acompanhado de detecção de carga parasitária baixa (0,29 parasitos/10<sup>3</sup> células do hospedeiro). O cão LPL-D143 foi positivo para todos os testes realizados em todos os momentos, sua IR variou em 0,42→0,60→0,69, sempre com carga parasitária detectável

(0,827→1,684→1,326 parasitos/10<sup>3</sup> células do hospedeiro). O responsável pelo cão LPL-D076 não autorizou a realização de todos os procedimentos na terceira visita (agosto de 2018), mas ele se manteve com IR intermediária (0,34→0,32→0,59), sendo positivo no RPA-LF nas duas primeiras avaliações (janeiro e abril de 2018) e com carga parasitária detectável apenas na primeira visita (janeiro de 2018) (**Anexo VI**).



## 5. DISCUSSÃO

Este estudo é composto por duas etapas onde 146 cães assintomáticos de uma área endêmica do Brasil foram avaliados de forma a comparar métodos diagnósticos disponíveis para Leishmaniose Visceral Canina. Somado a esses cães, 111 cães de diversos escores clínicos foram analisados visando a aplicação da metodologia de interpretação semiquantitativa do DPP®LVC (teste sorológico) associado ao RPA-LF (teste parasitológico) como forma de estadiamento e manejo dos cães infectados. Além disso, foi demonstrado a importância de cães com baixo escore clínico, mesmo que não fossem positivos para todos os testes realizados, na manutenção da doença na área em função da capacidade de infectar os vetores.

### 5.1. Caracterização do estudo, apresentações clínicas e comparação dos métodos diagnósticos para detecção da infecção

Nas áreas endêmicas de Leishmaniose Visceral, os cães infectados são o principal reservatório para a doença zoonótica e desempenham um papel importante na transmissão humana (Carvalho et al., 2018). A região de Governador Valadares corresponde a um importante foco de Leishmaniose Visceral tanto canina quanto humana. Neste estudo foram avaliados em um primeiro momento animais de baixo escore clínico, ou seja, animais que apresentavam no máximo um sinal clínico brando. Dentre esses cães, os sintomas mais frequentes foram alterações cutâneas e a linfonomegalia. Nas alterações cutâneas identificadas, se destacam a dermatite e a alopecia. A presença de lesões ulceradas no pavilhão auditivo foi bastante observada nos cães positivos para Leishmaniose Visceral Canina, assim como em um estudo conduzido na Bahia por Silva e colaboradores (2017), onde este tipo de lesão foi observada em 53,36% dos cães. Entretanto, a dermatite pode estar relacionada a diversas outras doenças, uma vez que não é um sintoma exclusivo da LVC (Cardoso et al., 2011), fazendo com que esta não seja a primeira suspeita clínica do caso.

O aumento no tamanho dos linfonodos foi o segundo sinal clínico mais frequente. Em diversos estudos, a linfadenomegalia foi relatada como o sinal clínico mais frequente em cães com LVC (Amusatogui *et al.*, 2013; Ciaramella *et al.*, 1997; Manna *et al.*, 2009; Moreno e Alvar, 2002; Silva *et al.*, 2017). Entretanto, como o aumento dos linfonodos é uma resposta frequente a agentes infecciosos, não se trata de um sinal específico para a doença (Silva *et al.*, 2017). Os demais sinais clínicos clássicos da LVC (Ciaramella et al., 1997; Quinnell et al., 2001) não foram observados nos cães do estudo. Em função dessa variabilidade de sinais clínicos e sua semelhança com outras patologias, o diagnóstico da LVC se torna uma tarefa difícil para os médicos veterinários, sendo a realização de exames laboratoriais

imprescindível.

Avaliando ainda os dados obtidos através da ficha dos animais positivos para pelo menos um dos testes, foi possível verificar que em doze casos, mais de um animal de uma mesma residência foi positivo. Um caso interessante é do animal LPL/UTMB017 e do animal LPL/UTMB018, o primeiro positivo no teste sorológico e o segundo negativo para todas as técnicas. O animal positivo vivia na parte externa da casa, juntamente com aves, já o outro passava a maior parte do tempo no interior da casa. Este dado corrobora com diversos autores que descreveram que o estilo de vida ao ar livre dos animais influencia no risco de se infectar, sendo que os cães que passam a noite ao ar livre tem uma soropositividade significativamente maior do que aqueles que dormem em ambientes fechados (Acedo Sánchez et al., 1996; Leal, 2017; Zaffaroni et al., 1999).

O controle da LV no Brasil baseia-se (i) no diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, (ii) na identificação e eutanásia de cães soropositivos e (iii) no controle de vetores (Peixoto et al., 2015). Até 2011, o protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde para a identificação dos cães com LVC era a realização do teste ELISA (IEE LVC, Biomanguinhos) com confirmação por imunofluorescência (IFAT, IFI LVC, Biomanguinhos). Recentemente, devido a discussões considerando a sensibilidade e especificidade desses métodos, um teste imunocromatográfico, o DPP®LVC (Dual Path Platform LVC, Biomanguinhos), foi introduzido como método de triagem, empregando o ELISA como método confirmatório, visando aumentar a precisão do diagnóstico e diminuir o número de falsos positivos (Fraga et al., 2016; Ministério da Saúde, 2014).

O teste DPP®LVC é um imunoensaio cromatográfico rápido baseado em uma plataforma de dupla via (DPP) desenvolvido por Biomanguinhos-Fiocruz para o diagnóstico de LV canina. Este teste utiliza uma combinação dos antígenos recombinantes rK9, rK26 e rK39 de *L. infantum*, constituindo o antígeno rK28 (Schubach et al., 2014). Entretanto, Laurenti e colaboradores (2014) relataram reação cruzada no DPP®LVC com babesiose em quatro dos nove animais testados. Já Paz e colaboradores (2018) reportaram pela primeira vez a detecção de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* através do teste DPP®LVC. Tal fato pode se tornar uma desvantagem em áreas endêmicas onde há sobreposição de espécies de *Leishmania*.

Em função da grande praticidade, simplicidade e rapidez na obtenção do resultado, o DPP®LVC possui grande aplicabilidade a campo. Nos Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) é utilizado a leitura visual do teste. Schubach, Figueiredo e Romero (2014) relataram em seu estudo que a concordância entre as leituras visual e eletrônica foi classificada como

quase perfeita. Dessa forma, visando evitar subjetividade na análise dos resultados, optou-se, neste estudo, pela utilização do leitor eletrônico fornecido por Biomanguinhos-Fiocruz como forma de obtenção do resultado. O leitor além de fornecer o resultado qualitativo (positivo/negativo), ainda fornece um valor referente a intensidade das bandas teste e controle, permitindo também uma análise semiquantitativa do DPP®LVC.

Os testes rápidos surgem para atender a demanda de um diagnóstico simples, eficiente e sem necessidade de equipamentos complexos, podendo ser aplicados nos centros de controles de diagnóstico e rotina clínica. Uma vez que o DPP®LVC não pode ser vendido para clínicas particulares, laboratórios desenvolveram seus próprios testes. Estes diversos testes rápidos estão disponíveis no mercado e em estudo recente foi demonstrado que estes apresentam uma excelente concordância com o DPP®LVC, com apenas um teste apresentando sensibilidade maior (Dantas-torres et al., 2018). Os testes rápidos disponíveis são todos baseados no antígeno recombinante rK39, que é um dos componentes da proteína quimérica rK28 contida no DPP® LVC. É possível, portanto, que o uso de mais de um antígeno cause competição por epítomos e diminua a sensibilidade. Experimentalmente, utilizando ensaios de ELISA com a mistura de antígenos rK26 e rK39, dois componentes do DPP®LVC, foi observado uma discreta diminuição de sensibilidade. Isto provavelmente se deve a sobreposição dos epítomos na mistura, o que não ocorre com o rK28, que é uma proteína quimérica recombinante e linear. Um estudo recente demonstrou que o somatório dos resultados obtidos com mais de um antígeno é capaz de aumentar a sensibilidade do teste (Martínez Abad et al., 2016).

Neste estudo, considerando apenas o DPP®LVC como método diagnóstico, obtivemos um total de 45/146 (30,8%) de positividade em cães com baixo escore clínico, que fica bem próximo quando da média de prevalência encontrada por Barata e colaboradores (2013), que seria 33,6%. Segundo a literatura, os cães sintomáticos apresentam níveis de anticorpos mais elevados que os assintomáticos, em geral produzem níveis elevados de anticorpos específicos (Mettler et al., 2005). Os testes ELISA e DPP®LVC detectam mais prontamente cães sintomáticos positivos do que os assintomáticos. É amplamente aceito que a imunidade contra LV depende de como o hospedeiro responde à infecção, seja por uma resposta imune Th1 ou Th2. Cães sintomáticos tendem a montar uma resposta Th2, levando a uma atividade policlonal de células B e, em seguida, a hipergamaglobulinemia (Barbiéri, 2006; Reis et al., 2009). Uma vez que estes ensaios sorológicos detectam IgG, é mais provável que detectem cães sintomáticos do que assintomáticos, em contraste com testes que detectam a presença do DNA, por exemplo, a PCR ou testes citológicos, que detectam o

próprio parasito (Nunes et al., 2015).

Além disso, estudos reportam que uma parte dos cães que residem nas áreas endêmicas estão infectados, mas geralmente permanecem soronegativos. Dessa forma, a sorologia poderia subestimar a verdadeira prevalência da infecção (Leontides et al., 2002). Ao considerarmos os animais positivos por pelo menos um dos testes, foi observada uma positividade de 60,6% (80/132). Quando avaliado separadamente, os testes moleculares detectaram 51,5% (68/132) animais positivos. A discordância observada entre resultados sorológicos e moleculares, com mais intensidade em animais assintomáticos, já foi reportada anteriormente (Carvalho et al., 2018; Lopes et al., 2017; Nunes et al., 2015). Isso se explica em função da relação entre infecção e dados sorológicos que muda durante o curso da doença (Quinnell et al., 1997) resultando em variação na porcentagem de positividade, bem como na sensibilidade de cada técnica diagnóstica. No início da infecção, exames parasitológicos e PCR são mais sensíveis. Com a evolução da infecção, os cães sintomáticos apresentam aumento dos níveis séricos de anticorpos e carga parasitária (Quinnell *et al.*, 2001, 2003). Em um estudo realizado em Araçatuba, São Paulo, a PCR foi capaz de identificar um maior número de cães assintomáticos, em comparação ao DPP®LVC e ELISA. A presença desses animais sorologicamente negativos na área endêmica configura um quadro preocupante, ainda mais considerando que esses animais assintomáticos permanecem na área endêmica podendo abrigar o parasito na pele, atuando como reservatórios da doença (Madeira et al., 2004) ou evoluírem para a doença polissintomática. Neste contexto, os testes moleculares se mostram úteis para vigilância epidemiológica da LVC e auxiliam na condução de estratégias de controle (Nunes et al., 2015)

Quando avaliamos todos os testes realizados no estudo, podemos observar que as maiores concordâncias são entre os testes moleculares, apresentando concordância moderada ou substancial conforme a classificação de Landis e Koch (1977). A concordância entre o DPP®LVC e as reações de qPCR foram moderadas, o que demonstra a boa capacidade de detecção de animais assintomáticos nesse estudo. A concordância entre o DPP®LVC e RPA-LF foi leve, tal fato pode ter ocorrido, pois o RPA-LF foi capaz de detectar animais precocemente infectados, antes que houvesse a conversão sorológica e níveis de anticorpos detectáveis.

O “padrão ouro” é o método, ou associação de métodos, que oferece resultados que são considerados classificações inequívocas. Seu uso é um pré-requisito necessário para comparar o poder de diagnóstico de qualquer teste. O único verdadeiro padrão de ouro para classificar um animal como infectado é o isolamento de agentes infecciosos ou critérios

histopatológicos inequívocos. Infelizmente, não existe tal padrão ouro para a infecção por *Leishmania* (Rodríguez-Cortés et al., 2010). Neste estudo, como não foram utilizados métodos de isolamento do parasita, adotamos os métodos moleculares como técnica de referência para os cálculos de sensibilidade, especificidade e valores preditivos, uma vez que se trata de testes que detectam o material genético do parasita. Nesse contexto, o DPP®LVC apresentou uma menor sensibilidade e maior especificidade que o RPA-LF. Os valores preditivos positivos e negativos, assim como a acurácia diagnóstica de ambos os testes foram bastante semelhantes. Com esses resultados podemos sugerir a complementariedade destes testes em um protocolo diagnóstico.

A qPCR foi utilizada de duas formas, tanto para diagnóstico quanto para avaliação/acompanhamento da carga parasitária. A qPCR com os iniciadores para kDNA, foi aplicada de forma qualitativa, visando determinar os animais positivos. Já a qPCR com iniciadores para ssrRNA serviu para identificação de animais positivos e determinação da carga parasitária. Como a quantidade de amostra proveniente da coleta é variável, em parte pelo porte, comportamento do animal e facilidade de palpação do linfonodo, foi imprescindível a utilização de um gene de referência (18S de mamíferos ou HPRT) para avaliar se realmente havia sido coletado material satisfatório para realização da PCR em tempo real. Essa metodologia foi adotada como forma de evitar resultados falso-negativo, nos casos onde não havia material suficiente para amplificação.

Utilizando os iniciadores para kDNA obtivemos 45/132 (34,1%) de animais positivos, enquanto com os iniciadores para ssrRNA um total de 33/132 (25%) animais foram positivos, representando um aumento de 9,1% na frequência de positividade. O PCR direcionado para o kDNA é considerado o método mais sensível para o diagnóstico de Leishmaniose, pois existem aproximadamente 10.000 minicírculos por parasita. As reações utilizando essa região, geralmente amplificam regiões conservadas específicas de gênero e subgênero (Bensoussan et al., 2006). Entretanto, reações de PCR que amplificam alvos como o ssrRNA (40 a 200 cópias / célula), também são utilizadas para diagnóstico, com bons resultados (Bensoussan et al., 2006; Pita-Pereira et al., 2012; Prina et al., 2007). O que torna uma vantagem para as reações tendo como alvo kDNA, também dificulta uma vez que contaminações e amplificações não específicas podem ocorrer, proporcionando resultados falsos positivos, sendo imprescindível o uso dos controles negativos.

Neste estudo, 17 animais foram positivos na qPCR com o iniciador de kDNA e negativos na qPCR com ssrRNA. Destes 17, seis deles não foram positivos em nenhum outro teste realizado. Devido à alta sensibilidade do alvo kDNA para detecção de *Leishmania*, é

possível que essas amostras correspondam a animais que possuem muito poucos parasitas. Cinco animais foram positivos para o alvo *ssrRNA* e negativo no *kDNA*, sendo que dois foram positivas apenas nesse teste, o que pode ter sido em função da diferença de amostra. A PCR em tempo real para *kDNA* foi realizado com DNA extraído de amostras conservadas em papel de filtro, enquanto a para *ssrRNA* com amostras oriundas da conservação com RNA Later® (Gray et al., 2013; Kato et al., 2010; McClure et al., 2009; Saieg et al., 2012). Embora ambas sejam maneiras eficazes de conservar a amostra, as diferentes formas de extração de DNA delas possuem eficiências diferentes. Adicionalmente, pode ter havido uma maior quantidade da amostra no papel de filtro, já que esta era a primeira a ser retirada da seringa, em consequência, parte das células que ficam retidas na agulha, eram expelidas na primeira aplicação da amostra, resultando em maior quantidade de DNA extraído.

Em relação ao diagnóstico pelo *ssrRNA* e carga parasitária, os animais tiveram suas amostras de sangue total e aspirado de linfonodo testadas. Foi observado que no caso dos animais com baixo escore clínico, o sangue total não representa uma boa amostra para diagnóstico, com apenas quatro animais positivos, enquanto a qPCR utilizando como amostra, o aspirado de linfonodo identificou 33 animais positivos. Entretanto, dentre os animais positivos no qPCR realizado com sangue, o animal LPL-D014 foi positivo apenas com essa amostra. Este animal se tratava de um cão de pequeno porte da raça Pinscher, evidenciando um potencial problema na utilização do aspirado de linfonodo, isso porque em animais menores, a palpação e coleta de amostra de forma satisfatória se torna mais complexa.

A amostra clínica utilizada nas técnicas moleculares influencia diretamente no resultado final. A sensibilidade mais baixa das amostras de sangue quando comparadas com aspirado de linfonodo já foi relatada na literatura (Reale et al., 1999), porém esta amostragem foi incluída no estudo em função da maior praticidade da coleta. As amostras de medula óssea e linfonodo produzem o maior número de resultados positivos em comparação com outros locais, independentemente do estado clínico (Almeida et al., 2013; Lombardo et al., 2012; Travi et al., 2018). Métodos diagnósticos menos invasivos e sensíveis, como a esfregaço da conjuntiva e a mucosa oral ou focinho também se apresentaram como boa alternativa para diagnóstico da LVC (Lombardo et al., 2012; Travi et al., 2018). O aspirado de linfonodo produziu uma frequência de positividade mais alta neste estudo, o que é corroborado por outros autores, associado ao fato de esta amostra poder ser obtida a campo com segurança para os animais. Por apresentar essa vantagem, esse tipo de amostra foi adotado como padrão para as demais análises. Com base nos resultados de maior detecção de animais infectados, o aspirado de linfonodo pode,

portanto, ser a amostra utilizada nos levantamentos epidemiológicos por técnicas moleculares para o diagnóstico da LVC.

A carga parasitária obtida na análise do aspirado de linfonodo variou de 96,04 a 1,165 x 10<sup>6</sup> parasitas/10<sup>6</sup> células do hospedeiro, correspondendo na carga máxima encontrada a 1,16 amastigotas/célula. Esses valores de carga parasitária mais baixa que comparado a carga parasitária do baço de animais sintomáticos (médio e alto escore clínico) era esperada por se tratar do grupo de animais com baixo escore clínico, que provavelmente estão no início da infecção (Verçosa et al., 2008) ou animais que apresentam uma resposta imunológica eficiente, mantendo baixa carga parasitária e controle da infecção (Solano-Gallego et al., 2011).

## **5.2. Aplicação da análise semiquantitativa do DPP®LVC em área endêmica**

Uma vez que o controle da Leishmaniose Visceral no Brasil é baseado (i) no diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, (ii) na identificação e eutanásia de cães soropositivos e (iii) no controle de vetores (Peixoto et al., 2015). A identificação dos cães positivos para LVC é de tamanha importância.

Medidas de controle como a detecção em massa de cães de cães soropositivos e o uso de pulverização com inseticidas de efeito residual de casas e abrigos de animais nem sempre são possíveis e mostraram resultados controversos (Romero e Boelaert, 2010). A relevância da eutanásia de cães soropositivos como medida de controle é amplamente discutida. Tem sido demonstrado que a eutanásia desses cães não afeta a disseminação da doença, e foi proposto que esse procedimento seja abandonado (Costa, 2011; Saraiva et al., 2012). Entretanto, em função das falhas observadas na vigilância e controle da LVC, não há dados suficientes para confirmar que a prática de eutanásia de animais soropositivos não é eficiente na redução da incidência de LV.

Além disso, atualmente, o custo do tratamento é muito alto, e ele não confere cura parasitológica dos cães, sendo passíveis de recidivas e por isso, exigindo um acompanhamento para toda a vida do animal (Andrade et al., 2011; Nogueira et al., 2019), tornando-o inviável para grande parte da população. O tratamento, portanto, não pode ser considerado uma medida de contenção a nível de saúde pública, conseqüentemente não interferindo no aumento de casos e a disseminação da LV para novos focos.

O controle da doença deveria então ser baseado na prevenção, associando produtos repelentes com a vacinação (Solano-Gallego et al., 2011). Entretanto nos deparamos com dois cenários, um em que os responsáveis dos animais desconhecem de fato as medidas profiláticas da LVC e, outro que, embora cientes dos procedimentos, os mesmos não

conseguem arcar com os custos da vacinação associada ao uso de repelentes. A profilaxia consiste em três doses com intervalo de 21 dias na primovacinação, seguida de revacinação anual (Leish-Tec®, Hertape Calier Saúde Animal S/A), associado a utilização de produtos repelentes/inseticidas por via tópica (coleiras, dispositivos *SpotOn* ou *Sprays*). Esses repelentes/inseticidas que tem validade variável, sendo necessária a reaplicação do produto ou troca das coleiras repelentes periodicamente, o que torna o custo elevado e difícil de implementar a nível nacional (Reithinger et al., 2004). Além disso, a vacina atualmente no mercado possui eficácia limitada (Grimaldi et al., 2017), podendo dar uma falsa sensação de segurança.

Assim, quando as medidas profiláticas não são realizadas, a infecção/doença se instala, caso não haja adesão ao tratamento por parte do responsável do animal, a identificação e a eutanásia dos animais infectados precisam ser mantidas devido ao risco de total descontrole desta doença. No entanto, Grimaldi e colaboradores (2012) destacam a importância da manutenção de animais resistentes com título de anticorpos baixo ou flutuantes, que ao permanecer na área para se reproduzir, aumentaria a quantidade de cães resistentes.

Alguns pontos fundamentais devem ser considerados para a compreensão da não efetividade da eutanásia nos programas de controle da Leishmaniose Visceral, tais como: a alta incidência de infecção e capacidade de infectar o vetor, à baixa sensibilidade dos testes diagnósticos para detectar cães que servem de fonte de infecção para o vetor e o longo intervalo de tempo entre o diagnóstico e a remoção dos animais soropositivos para eutanásia em áreas endêmicas e ainda, apenas uma parte desses animais é removida (Courtenay et al., 2002). Além disso, observa-se uma rápida substituição dos cães infectados removidos por animais jovens e suscetíveis. Uma outra questão é que em determinadas áreas, os caninos não são o reservatório primário para a LV, com gambás (*Didelphis* sp.) servindo como um reservatório peridoméstico de *L. infantum*, impedindo que a doença tanto humana quanto canina seja controlada somente com a eutanásia dos cães (Grimaldi *et al.*, 2012, 2017).

Neste cenário, uma ferramenta diagnóstica mais precisa, especialmente para animais assintomáticos, poderia ser valiosa para medidas de controle. Portanto, neste estudo é proposto o uso de técnicas disponíveis para estabelecer um manejo racional de animais soropositivos, detectando e mantendo animais com perfis resistentes na área endêmica. Para tanto, DPP® LVC seria o teste sorológico para o diagnóstico de LVC, sendo realizado RPA-LF como teste parasitológico complementar sempre que necessário.

O DPP®LVC é um teste rápido com alta sensibilidade e especificidade. O uso



semiquantitativo do DPP®LVC já havia sido proposto, onde foi considerado o tempo até o aparecimento da banda de teste e sua correlação com a carga parasitária (Larson et al., 2016). Neste estudo, também foi demonstrado o uso semiquantitativo do DPP®LVC para inferir o nível de infecção. Em função de possíveis intercorrências de ordem físico-química e erro humano na realização do teste, ele deve ser sempre corrigido pelo uso da razão entre a banda teste e a banda controle. Essa abordagem garante que o resultado obtido na banda teste seja confiável, já que a banda controle foi submetida às mesmas condições da faixa de teste em relação à temperatura, quantidade de amostra, quantidade de tampão de corrida durante a execução do teste. Ao utilizarmos a mesma alíquota de soro, em testes em dois momentos diferentes, poderia haver uma variação na intensidade das bandas, levando a interpretação de uma banda mais fraca ou mais forte, mas quando normalizamos com a banda de controle, os resultados são equivalentes. Essa abordagem nos permite comparar os resultados obtidos com diferentes lotes de fabricação de DPP®LVC e realizados ao longo do tempo e em diferentes locais. Para isso, empregamos o índice de reatividade ou IR, que é obtido semiquantitativamente com os valores da intensidade de banda a partir de um leitor de teste rápido, mas essa abordagem pode ser adaptável a leitura visual.

Apesar da alta sensibilidade e especificidade do teste DPP® LVC, o ELISA ainda é usado como teste confirmatório para definir um animal como positivo; este teste tem alta sensibilidade e especificidade média a baixa (Laurenti et al., 2014). Já foi proposto que o ELISA deveria ser o teste de triagem e DPP®LVC, o teste confirmatório (Coura-vital et al., 2014; Laurenti et al., 2014), o que embora pareça mais racional, torna o processo do diagnóstico menos prático.

Dessa forma o DPP®LVC, por ser um teste rápido com bom desempenho, poderia ser método de diagnóstico sorológico para a LVC em áreas endêmicas. Uma desvantagem são os animais que apresentam uma banda de teste fraca correspondente aos animais recentemente infectados, resistentes ou, em alguns casos, falsos positivos (Laurenti et al., 2014; Paz et al., 2018). Para superar tais questões, propomos associar o RPA-LF como teste parasitológico complementar, com repetição do teste depois de dois meses, de modo que os animais recém-infectados e alguns dos animais falsos positivos pudessem ser detectados, assim como revelar animais que provavelmente desenvolverão a doença, estes seriam detectados por um aumento de IR, e falsos negativos, que devem ser tratados como animais resistentes, seriam submetidos a monitoramento periódico. Animais com baixo escore clínico e baixa reatividade à DPP®LVC geralmente flutuam positivamente para esse teste e podem representar um grupo de cães que deve permanecer para se reproduzir e ajudar no controle

da LVC, como já proposto (Grimaldi *et al.*, 2012).

Utilizando os valores de IR obtidos de 111 animais positivos para LVC que foram eutanasiados entre 2009 e 2011 no Mato Grosso, área de LVC endêmica no Brasil, observou-se que os valores de IR correlacionam com os sinais clínicos, mostrando animais com baixos escores clínicos resultam em menores valores de IR quando comparados aos animais que apresentam altos escores clínicos. Animais com maior carga parasitária no baço apresentaram altos valores de IR. É relevante mencionar que já foi demonstrado que o escore clínico não é uma boa maneira de agrupar os animais, principalmente devido à falta de especificidade dos sinais clínicos e à variação observada individualmente entre os animais. Por sua vez, a carga parasitária esplênica é um excelente correlato da gravidade da doença (Cavalcanti *et al.*, 2015).

O baço é um dos principais órgãos acometidos durante a LVC, onde os parasitos se multiplicam sem controle e sendo responsável pela persistência parasitária. Tem sido demonstrado que uma intensa proliferação do parasita ocorre nesse órgão e se correlaciona com sua desorganização estrutural (Santana *et al.*, 2008). Outros autores mostraram que em animais com desorganização esplênica intensa, a expressão de quimiocinas (Nascimento *et al.*, 2013) e citocinas pró e anti-inflamatórias foi reduzida (Cavalcanti *et al.*, 2015), assim como os folículos linfóides e células T CD4<sup>+</sup> (Silva *et al.*, 2018). Portanto, a carga parasitária esplênica é um excelente marcador de gravidade na LVC, e o fato de a IR se correlacionar com a carga parasitária indica que a IR pode ser uma ferramenta importante para se inferir sobre a gravidade da LVC. Os resultados aqui obtidos indicam que um animal com alta carga parasitária esplênica tem probabilidade 3,8 vezes maior de apresentar  $IR \geq 1,0$ . A correlação é significativa, embora não completa ( $r = 0,3867$ , valor de  $p < 0,0001$ ). Este resultado pode ser justificado pela: à variedade de animais - considerando tamanho, raça, nível de exposição e características genéticas; a variabilidade da carga parasitária em diferentes partes de um órgão infectado ou em diferentes tecidos (Bagues *et al.*, 2018) e o fato de que animais gravemente afetados pela doença podem se tornar imunossuprimidos e, portanto, apresentarem decréscimos em títulos específicos de anticorpos. Já foram relatadas células B em processo de exaustão celular que poderiam ser responsáveis por essa redução no título de anticorpos específicos (Souza, 2018). Quando distribuídos nos quatro intervalos de IR, a maioria dos animais com baixa IR também tem menor carga parasitária quando comparados com aqueles com alta IR.

De forma a avaliar a aplicabilidade do índice de reatividade, um grupo de 146 cães com baixo escore clínico de uma área endêmica de Governador Valadares, MG, que

apresenta alta prevalência e incidência de LVC foram avaliados. Resultados negativos após qPCR ou baixa de carga parasitária foram observados em todos os animais deste grupo, provavelmente porque os animais apresentaram escores clínicos baixos. Portanto, apenas resultados positivos ou negativos foram considerados após o qPCR. Dos 146 animais avaliados, 101 cães foram negativos para DPP®LVC; destes animais, nove foram positivos para qPCR. Entre os animais positivos para DPP®LVC, 21 foram negativos para qPCR. Ocorrência de resultados discordantes entre DPP®LVC e testes moleculares são frequentemente relatados (Carvalho *et al.*, 2018). Isto é mais um elemento que coloca a ideia de que um teste padrão-ouro não é possível até o momento e que os testes devem ser utilizados de forma racional e complementar.

A discordância entre os resultados obtidos pelos ensaios sorológicos e moleculares não compromete o uso de IR na tomada de decisão. Por exemplo, animais com a menor IR devem ser monitorados para avaliar se eles se tornam mais reativos ao longo do tempo, o que mudaria sua classificação de IR. Os resultados apresentados neste estudo mostram boa concordância entre DPP®LVC e qPCR, bem como uma boa correlação entre a IR e a carga parasitária. No entanto, como muitos animais com baixo escore clínico foram negativos para ambos os testes, a correlação mais uma vez não foi perfeita ( $r = 0,4548$ ), porém significativa ( $p < 0,0001$ ). Esse achado é explicável, já que as correlações entre métodos de natureza diferentes não são perfeitas. Essa correlação imperfeita foi demonstrada pelo uso semiquantitativo da DPP®LVC, considerando o tempo para se tornar positiva versus carga parasitária (Larson *et al.*, 2016). Neste caso, ao aplicar a abordagem semiquantitativa para alocar os resultados da DPP®LVC em grupos baseados em IR, os níveis de IR e positividade em qPCR foram associados. Assim, a maioria dos cães com  $IR < 0,2$  era negativa ou apresentava baixa carga parasitária, e todos os animais com valores de  $IR \geq 1,0$  foram positivos para qPCR ou apresentaram alta carga parasitária.

### **5.3. Aplicação da RPA-LF como método molecular alternativo nos postos de atendimento**

Um fator limitante para a utilização da PCR para diagnóstico dos cães é a necessidade de uma estrutura laboratorial mais complexa, com equipamentos caros e pessoal treinado, o que limita muito a sua implementação em áreas endêmicas. Através de uma técnica de amplificação isotérmica, a *Recombinase Polymerase Amplification* (RPA) para detectar *L. infantum* acoplado a um sistema de leitura de fluxo lateral (LF) é possível obter um teste molecular semelhante a PCR capaz de ser aplicada nos centros de diagnósticos em áreas endêmicas, como os CCZs. O

RPA-LF apresentou uma sensibilidade semelhante à PCR em tempo real, detectando-se DNA equivalente a 40 parasitas/mL (Castellanos-Gonzalez et al., 2015).

Neste estudo, o RPA-LF de amostras de linfonodo detectou 55/132 indivíduos positivos, apresentando uma sensibilidade e especificidade de 0,76 em relação a PCR com iniciadores para kDNA. Já com os iniciadores para ssrRNA apresentou uma sensibilidade de 0,91 e especificidade de 0,75. Quando comparado com ambos os alvos, apresentou uma correlação moderada. Ao analisarmos através de tabelas de contingência, podemos verificar que a RPA-LF apenas deixou de detectar 13 cães positivos para pelo menos uma das qPCR realizadas. Por um outro lado, a RPA-LF detectou 18 animais positivos que não foram identificados na qPCR. Em função desses achados, sugerimos a utilização da RPA-LF como uma técnica molecular de alta sensibilidade e especificidade quando comparada com os iniciadores utilizados nesse estudo, que poderia ser aplicada de forma alternativa a qPCR em postos de atendimento, complementando os achados do DPP®LVC.

Nas amostras de aspirado de linfonodo, não foi possível observar uma relação entre a carga parasitária e a positividade pela RPA-LF. Apenas três animais positivos na qPCR com iniciadores para ssrRNA não foram positivos no RPA-LF e estes apresentavam cargas variadas ( $6,09 \times 10^2$ ;  $6,64 \times 10^4$  e  $8,63 \times 10^4$  parasitas/ $10^6$  células de cão). Utilizando amostras de sangue, apenas quatro animais foram positivos na RPA-LF, os mesmos que também apresentaram amplificação com o alvo ssrRNA. Pelo resultado aquém do obtido quando comparado com as amostras de aspirado de linfonodo, o sangue não foi considerado uma boa amostra para realização do RPA-LF em cães com baixo escore clínico.

Quando avaliado os resultados da RPA-LF e DPP® LVC, podemos observar que estes apresentam a apenas uma correlação leve. Observando os dados da tabela de contingência, nota-se que 35,6% dos resultados são discordantes. Estes resultados possivelmente se devem a animais em momentos diferentes do curso da infecção, sendo os cães positivos apenas no RPA-LF, animais infectados a pouco tempo que ainda não apresentaram soroconversão. Enquanto os animais que apresentam apenas o DPP®LVC positivo, representam animais expostos, mas não infectados ou que estão apresentando controle da carga parasitária.

De forma a aplicar o conceito de avaliação semiquantitativa do DPP® LVC, realizamos a distribuição dos animais de acordo com o resultado da RPA-LF nas faixas de índice de reatividade. Assim, a maioria dos animais com  $IR \geq 0,5$  são positivos na RPA-LF, representando animais com a LVC já em curso, que necessitam de intervenção médica veterinária o mais rápido possível. Enquanto os animais com  $IR < 0,2$  e positivos na RPA-LF, representam um grupo de cães não sororeagentes, que tem suma importância, pois se tratam de

animais infectados que não seriam identificados com o teste DPP® LVC, que podem ter um papel importante na manutenção da LVC na área endêmica.

#### **5.4.Importância dos cães assintomáticos na capacidade de infectar os vetores**

A alta suscetibilidade dos cães, a natureza gregária e a associação com humanos, os posicionam como um eficiente reservatório para transmissão de *L. infantum* para humanos (Dantas-Torres, 2007; Dantas-Torres et al., 2012; Otranto e Dantas-Torres, 2013). Está provado que os cães infectados são fontes de infecção para os flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis*, o principal vetor do agente etiológico da Leishmaniose Visceral zoonótica no Novo Mundo (Dantas-Torres, 2007). Estes flebotomíneos podem facilmente adaptar-se ao ambiente peridoméstico ou habitações humanas e alimentam-se frequentemente de cães (Dantas-Torres, 2007; Lainson and Rangel, 2005). Em um estudo conduzido na Amazônia em 1996, foi calculado que nove casos secundários são decorrentes de um caso primário em uma população suscetível, demonstrando a importância epidemiológica dos cães nesse contexto (Quinnell et al., 1997; Quinnell e Courtenay, 2009).

Cães podem apresentar um parasitismo cutâneo intenso por amastigotas aumentando a possibilidade de transmissão (Dantas-Torres, 2007). Evidências crescentes sugerem que a infecciosidade dos pacientes para o vetor da Leishmaniose Visceral está ligada a parasitos encontrados na pele. Utilizando um modelo murino que apresenta infecção cutânea extensa por *Leishmania donovani*, as análises espaciais em escalas macro- (PCR quantitativa) e micro- (microscopia confocal) indicaram que a distribuição de parasitas é marcadamente irregular, o que reduz o número esperado flebotomíneos infectados (Doehl et al., 2017). Em cães, já foi relatado que pele da orelha tendia a ser mais infecciosa para os vetores do que a do abdome (Travi et al., 2001).

A presença de altas cargas parasitárias em locais do corpo, como as orelhas, que são mais acessíveis aos flebotomíneos associaram-se positivamente com a capacidade de ser fonte de infecção para o vetor (Courtenay et al., 2014). No entanto, a utilização do xenodiagnóstico onde os vetores são alimentados em hospedeiros infectados ainda é a base para avaliar a capacidade do hospedeiro (cães, humanos, animais) infectar o vetor (Fernandes et al., 2014; Verçosa et al., 2008). Por essa razão, neste estudo o xenodiagnóstico foi utilizado como ferramenta biológica para avaliar a capacidade do cão infectar o vetor, utilizando o pavilhão auditivo como local para realização do teste.

Para cálculo da capacidade do cão infectar o vetor, adotamos o cálculo da taxa de infecção mínima (TI), descrita por Paiva e colaboradores (2006), a qual considera que pelo

menos um dos insetos do *pool* de dez fêmeas está infectado. Embora não tenha havido diferença estatística significativa nas médias de TI, nota-se que o valor mais alto possível (10%) foi obtido nos grupos contendo animais positivos para todos os testes realizados. Somente nesse grupo foi obtido a TI máxima, inclusive em animais que não apresentavam nenhum sinal clínico.

Cães polissintomáticos são descritos como mais infecciosos para *Lu. longipalpis* que os oligo ou assintomáticos (Travi *et al.*, 2001; Costa-Val *et al.*, 2007), sendo essa correlação é mais acurada quando a carga parasitária também é considerada (Courtenay *et al.*, 2014). Entretanto, estudos mostram que cães assintomáticos são altamente infectantes e competentes em estabelecer infecção nos flebotomíneos (Michalsky *et al.*, 2007). Mendonça e colaboradores (2017) reportam que a proporção de *Lu. longipalpis* infectada no xenodiagnóstico foi maior nos cães assintomáticos que nos cães sintomáticos. Estes achados de Mendonça e colaboradores (2017) e Michalsky e colaboradores (2007) corroboram os dados desse estudo, indicando o papel desses cães na manutenção do ciclo de *L. infantum*, bem como o seu envolvimento na disseminação de LV em áreas endêmicas

Em função da segurança para os responsáveis dos animais, foi imprescindível a colocação de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em todos os animais do estudo. Entretanto, a ação da coleira prejudicou a realização do segundo xenodiagnóstico. Uma vez que nos animais que ainda apresentavam a coleira, havia resistência a alimentação por parte dos vetores, assim como óbito precoce dos insetos. Outro fator que comprometeu a análise estatística, foi o elevado número de óbitos durante o intervalo entre a segunda e terceira visita. A perda da coleira é um achado frequente em estudos com cães, sendo relatada a remoção por proprietários por coceira, irritação e dermatite em cães que usavam coleiras; brigas entre animais; remoção de coleira pelos animais, principalmente por cães semi-domiciliados, pois a maioria não estava acostumada a usar coleiras (Albuquerque e Silva *et al.*, 2018). Neste estudo, as perdas foram principalmente pela remoção da coleira pelos responsáveis em função da insegurança no seu uso nos cães e perda da coleira dos cães semi-domiciliados. Não houve relatos de efeitos colaterais.

Já foi descrito que o parasitismo cutâneo não é crucial para a capacidade de infectar o vetor, mas a presença de *Leishmania* nos linfonodos era significativamente relacionada a um xenodiagnóstico positivo (Laurenti *et al.*, 2013). Nesse estudo essa relação não foi verificada. Enquanto Laurenti e colaboradores (2013) utilizaram fragmentos de linfonodo, neste estudo foi usado aspirado de linfonodo, o que garante uma quantidade de amostra limitada, que pode ter influenciado no resultado final. Portanto, a presença de pelo menos um teste positivo para

LVC, , sendo este sorológico ou parasitológico, já serve como alerta para possível capacidade de infectar o vetor, sendo imprescindível o encoleiramento desse animal.

O desenvolvimento de testes precisos, capazes de detectar não só cães parasitologicamente positivos sintomáticos, mas também cães assintomáticos soropositivos já capazes de infectar os flebotômíneos é de suma importância (Grimaldi *et al.*, 2012). Visando avaliar qual dos testes realizados nesse estudo apresentaria maior capacidade de detectar os cães capazes de infectar os insetos vetores, os resultados dos testes laboratoriais foram correlacionados com o xenodiagnóstico. Nesse contexto, o RPA-LF apresentou maior capacidade de detecção dos animais positivos no xenodiagnóstico. O fato de existirem animais positivos no xenodiagnóstico, ou seja, animais que apresentam amastigotas na pele da orelha, capazes de infectar o vetor, e negativos para infecção para *L. infantum* nos outros testes realizados, sugere que a presença de parasitos na pele ocorre bastante precocemente, inclusive antes da soroconversão dos animais, reforçando a necessidade de um diagnóstico precoce desses animais.

De forma a associar as duas metodologias rápidas e passíveis de serem realizadas em posto de atendimentos, avaliamos o DPP®LVC com o RPA-LF. Usando como critério a positividade para pelo menos um desses testes, 87,5% dos cães com baixo escore clínico capazes infectar o inseto vetor são identificados, enfatizando a necessidade da combinação de testes de natureza diferentes (sorológicos e parasitológicos) para que a intervenção nesses animais seja realizada em período oportuno, interrompendo a cadeia de transmissão da LVC.

### **5.5. Acompanhamento e manejo de cães com baixo escore clínico em área endêmica**

De forma a avaliar a aplicabilidade do índice de reatividade (IR) e o RPA-LF como teste parasitológico complementar, realizou-se o acompanhamento de 40 animais com baixo escore clínico. Quando alocamos esses animais nas faixas de IR previamente determinadas, podemos verificar que grande parte dos animais positivos na RPA-LF se encontram na faixa de  $IR < 0,2$ . Nas outras duas faixas, a concordância entre o resultado obtido no DPP® LVC e RPA-LF é maior. Dessa forma podemos perceber que mesmo após três meses, alguns animais infectados ainda não apresentam títulos de anticorpos detectáveis pelo DPP® LVC.

Existe um elevado número de animais capazes de infectar o vetor na faixa de  $IR < 0,2$  que são positivos na RPA-LF. Já nas demais faixas de IR, a maior parte dos animais (5/8 cães) também é positivo no xenodiagnóstico.

Ao tomarmos por critério, a capacidade do cão infectar o vetor, utilizando apenas o DPP® LVC, entre os animais alocados nas faixas de  $IR > 0,2$ , todos os cinco animais positivos

no xenodiagnóstico são identificados. Já na faixa de  $IR < 0,2$ , que seria uma faixa que demandaria menor atenção imediata, dezenove animais são capazes de infectar o vetor. Quando associamos o RPA-LF, treze desses dezenove animais são identificados. Estes resultados demonstram a importância da associação de um teste molecular. Neste estudo sugerimos o RPA-LF, principalmente na faixa de  $IR < 0,2$ . Nas demais faixas, o DPP®LVC tem bom poder de detecção desses animais xenodiagnóstico positivo.

Três animais com valores de IR entre 0,5 e 1,0 morreram em um período de menos de três meses. Esses animais com IR elevada apresentaram piora do quadro clínico, evoluindo a óbito rapidamente. Quando avaliamos os doze óbitos que ocorreram no período subsequente, apenas um cão apresentava  $IR > 0,5$ . Por se tratar de um estudo onde os cães foram mantidos com seus responsáveis, muitas vezes sob o regime semi-domiciliado, não podemos afirmar que os óbitos ocorreram todos em função da LVC. Entretanto a presença de testes parasitológicos positivos nesses animais indica a presença da infecção persistente.

A observação do conjunto desses animais denota a característica individual de resposta imunológica que cada animal irá apresentar no decorrer da doença. Uma flutuação nos resultados do DPP®LVC já foi relatada por Grimaldi e colaboradores (2012). Assim como uma flutuação na carga parasitária também foi observada nesse estudo. Dados de literatura sugerem que a população canina em áreas endêmicas é provavelmente composta de quatro grupos de hospedeiros mutuamente exclusivos: aqueles suscetíveis, aqueles resistentes, aqueles suscetíveis que se tornam latentes após uma picada do vetor (assintomático) e aqueles capazes de infectar o vetor que emergem de caninos latentes a uma taxa constante (Grimaldi et al., 2012). Dessa forma, os animais podem ser classificados em expostos, apenas com sorologia positiva; infectados, que apresentam parasitológico e/ou sorologia positivas, mas sem sinais clínicos e os animais doentes de fato, que possuem testes laboratoriais positivos e sinais clínicos de LVC (Paltrinieri et al., 2010; Solano-Gallego et al., 2011). Assim como, a expressão clínica da infecção por *L. infantum* em cães é altamente variável, dependendo do estado imunológico do hospedeiro e outros fatores genéticos que influenciam a suscetibilidade canina à LV. Cães gravemente afetados não sobrevivem à doença, embora infecções subclínicas possam ocorrer comumente em cães, como ocorre em humanos (Grimaldi et al., 2012).

Outro ponto relevante que foi demonstrado pelo monitoramento dos animais foi o risco da presença de um animal com alta IR no domicílio para transmitir a um animal negativo e, portanto, possivelmente para humanos. Como o que ocorreu no caso do animal LPL-D118 ( $IR=0,65$ ) que convivia com o cão LPL-D117, que era inicialmente negativo,



positivando a partir da segunda visita. Outros autores relataram que a carga parasitária, que foi demonstrada neste estudo estar relacionada a IR, está diretamente associada à capacidade de infectar os vetores de flebotomíneos (Courtenay et al., 2014).

Os dados obtidos no acompanhamento dos animais, justifica o estadiamento dos animais em diferentes intervalos de IR, bem como o a redução do intervalo de tempo para o novo teste dos animais, assim como a aplicação de um teste parasitológico. Embora o teste de animais a cada dois meses possa ser uma tarefa difícil, as outras medidas sugeridas neste estudo, como não usar o ELISA como teste confirmatório e tomar decisões imediatas com base na IR associada com a RPA-LF, reduzirão o tempo necessário para se obter uma resposta para vigilância epidemiológica da LVC.

#### **5.6. Recomendações no manejo de cães de áreas endêmicas de Leishmaniose Visceral Canina baseadas no conceito de índice de reatividade, positividade nos testes moleculares e capacidade do cão infectar o vetor**

Tendo em vista que o DPP®LVC já vem sendo amplamente utilizado no Brasil para a vigilância e controle da LV e, ainda, considerando os resultados apresentados neste estudo, propomos o DPP®LVC com o escalonamento em faixas de IR seja aplicado. Este deverá ser usado como teste de triagem e acompanhamento, quando necessário, dispensando o uso de ELISA como teste confirmatório, conforme preconizado (Ministério da Saúde, 2014). Para alguns casos, testes parasitológicos, tais como o esfregaço de linfonodo ou aspirado de medula óssea, ou mesmo o RPA-LF, podem ser necessários. Entendemos ainda, que cada caso deve ser analisado individualmente e no caso de algum teste confirmatório seja necessário por razões legais, este deve ser parasitológico. O teste RPA-LF com amostras de linfonodo é um candidato promissor a teste molecular capaz de detectar a presença do DNA do parasito, com fácil execução. Isso porque ele apresentou boa concordância com a qPCR tanto com iniciadores para kDNA (78,8%), como ssrRNA (75,8%) e boa capacidade de identificar animais que infectam os vetores.

Um teste molecular adicional ao DPP®LVC pode ser considerado complementar, pois é capaz de identificar animais infectados em situações onde ainda não há níveis de anticorpos detectáveis, sendo uma importante ferramenta da identificação de animais infectados que passariam por falso negativos caso apenas o teste sorológico fosse realizado.

Caso algum teste seja positivo, o acompanhamento deste animal deve ser realizado e o mesmo mantido com coleiras repelente. Somente desta maneira poderemos ter certeza de





exclusão de falsos positivos ou negativos, pois resultados díspares são amplamente discutidos na literatura (Lopes et al., 2017; Mendonça et al., 2017; Solano-gallego et al., 2011).

A interpretação do DPP® LVC deve considerar a relação entre a banda teste e a banda controle, não assumindo somente um resultado qualitativo, como negativo ou positivo, pois além de minimizar possíveis problemas de comparação, é a única forma de semiquantificar a resposta do animal, estando esta resposta sorológica intimamente relacionada a carga parasitária e esta à apresentação clínica. Com base nos dados do acompanhamento dos animais, foi estabelecido uma série de recomendações de manejo clínico dos animais, levando em consideração os valores de IR.

O tratamento foi sempre colocado como uma das opções para manejo dos cães, mas como nem sempre será possível, a eutanásia continua sendo uma opção, tanto no âmbito de saúde pública, quanto da qualidade de vida do animal infectado. O prognóstico de um possível tratamento também pode ser baseado nos dados IR do DPP®LVC, uma vez que refletem o nível de infecção dos animais (**Tabela 5.1**).

O índice de reatividade (IR) baseado no teste DPP®LVC pode ser usado para realizar um estadiamento dos cães (**Tabela 5.1**), classificando-os de acordo com o risco de transmissão e encaminhando os cães para tratamento ou eutanásia, caso o tratamento não seja uma realidade para o responsável do animal, seguindo assim as recomendações internacionais (Solano-Gallego et al., 2011) e assessoria dos ministérios brasileiros (Ministério da Agricultura, 2016). Apesar dos estudos mostrarem um baixo impacto da remoção de animais soropositivos de áreas endêmicas (Costa, 2011; Saraiva et al., 2012), esta abordagem ainda é a única alternativa em relação a animais em más condições de saúde ou mesmo, quando os responsáveis dos cães não querem ou não podem arcar com os custos do tratamento. Os resultados aqui demonstrados, indicam que a evolução clínica pode ser rápida, sendo necessário atenção permanente. O prognóstico para o tratamento de acordo com o estadiamento dos animais é desfavorável para os animais intensamente parasitados com múltiplos órgãos comprometidos (Solano-Gallego et al., 2011) ; portanto, devemos manter o uso da eutanásia, não apenas como uma medida de controle da LVC, mas também como um procedimento que visa aliviar o sofrimento de animais já sem qualidade de vida que morrerão dolorosamente sem tratamento e acompanhamento adequados.

**Tabela 5. 1.** Recomendações de manejo dos cães em áreas endêmicas para Leishmaniose Visceral Canina

<b>Faixas de Índice de Reatividade*</b>	<b>Teste Confirmatório</b>	<b>Procedimento**</b>	<b>Prognóstico</b>
$IR \geq 1,0$ 	Teste Parasitológico	Tratamento com leishmanicida <sup>1</sup> e leishmanioestático <sup>2</sup> ou eutanásia imediata (dias).	Desfavorável para sintomático e favorável para assintomático.
$0,5 \leq IR < 1,0$ 	Teste Parasitológico	Tratamento com leishmanicida <sup>1</sup> e leishmanioestático <sup>2</sup> ou eutanásia imediata (em até um mês).	Desfavorável para sintomático e favorável para assintomático
$0,2 \leq IR < 0,5$ 	Repetir DPP®LVC em dois meses Teste Parasitológico	Tratamento com leishmanicida <sup>1</sup> e leishmanioestático <sup>2</sup> ou eutanásia imediata (em até dois meses).	Reservado
$IR < 0,2$ 	Repetir DPP®LVC em dois meses Teste Parasitológico	Tratamento com imunomoduladores <sup>3</sup> . Caso animal sintomático, proceder como $IR \geq 1.0$ .	Desfavorável para sintomático e favorável para assintomático

\* Faixas de IR sugeridas para estadiamento racional dos cães e posterior tomada de decisão;

\*\* Procedimentos indicados. Para todas as faixas de IR recomenda-se o uso de produtos repelentes

<sup>1</sup>Miltefosina 2 mg / kg / VO / 24 horas durante 28 dias; <sup>2</sup>Alopurinol 0-20 mg / kg / VO / 12 horas, uso contínuo; <sup>3</sup>Domperidona 0.5-1 mg / kg / VO / 24 horas durante 30 dias.

## 6. CONCLUSÕES

1. Em áreas endêmicas existe uma parcela de animais infectados que não são identificados pelo teste sorológico rápido DPP, sendo necessária associação de testes parasitológicos, no caso deste estudo testes moleculares, para sua identificação.
2. O RPA-LF se mostrou um teste molecular com correlação moderada com ambas as PCR em tempo real realizados, porém sem necessidade de grandes recursos laboratoriais e técnicos, sendo viável para a realização em postos de atendimento.
3. A avaliação semiquantitativa do teste DPP@LVC se mostrou promissora. O uso de um índice de reatividade (IR) baseado na relação da banda teste com a controle, é melhor que a avaliação da banda teste sozinha, possuindo correlação com a carga parasitária esplênica e permitindo o estadiamento dos animais.
4. A PCR em tempo real é capaz de identificar animais que ainda não apresentam títulos de anticorpos detectáveis. O aspirado de linfonodo se mostrou a amostra com melhor capacidade de identificar mais animais positivos quando comparado com o sangue total.
5. A RPA-LF demonstrou ser um bom candidato a teste parasitológico rápido para ser associado ao DPP@LVC, pois animais recém infectados, que ainda não apresentam soroconversão detectável, são identificados pelo RPA-LF, demonstrando complementariedade desses testes diagnóstico.
6. Cães de baixo escore clínico de áreas endêmicas percorrem cursos clínicos diferentes, podendo evoluir a óbito em menos de três meses ou mesmo se manter assintomáticos por sete meses. Apresentando flutuações no título de anticorpos e carga parasitária do linfonodo em exames seriados.
7. A infectividade para o vetor esteve presente em cães com baixo escore clínico com resultados laboratoriais variáveis, sem diferença estatística entre os valores de taxa de infecção mínima, mas com as maiores taxas presentes em animais positivos para os testes sorológico e moleculares, reforçando a importância desses animais na transmissão da Leishmaniose Visceral.
8. O teste RPA-LF foi o que mais identificou animais capazes de infectar o vetor, sendo importante a sua realização principalmente em animais com  $IR > 0,2$ , visando detectar precocemente focos de infecção para o vetor.
9. O estadiamento dos animais de acordo com o índice de reatividade associado com o RPA-LF, se mostrou uma ferramenta simples e de baixo custo que permite a identificação de cães infectados em áreas endêmicas, podendo ser aplicados no manejo para controle da Leishmaniose Visceral.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acedo Sánchez C, Martín Sánchez J, Vélez Bernal ID, Sanchís Marín MC, Louassini M, Maldonado JA et al. Leishmaniasis Eco-epidemiology in the Alpujarra Region (Granada province, southern Spain). *Int J Parasitol* 1996; 25(3): 303-310. doi: 10.1016/0020-7519(95)00124-7

Adams ER, Jacquet D, Schoone G, Gidwani K, Boelaert M, Cunningham J. Leishmaniasis Direct Agglutination Test: Using Pictorials as Training Materials to Reduce Inter-Reader Variability and Improve Accuracy. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:1–6. doi:10.1371/journal.pntd.0001946.

Agut A, Corzo N, Murciano J, Laredo FG, Soler M. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. *Vet Rec* 2003;153:648–652. doi: 10.1136/vr.153.21.648

Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 2003;17:1–18. doi: 10.1046/j.1365-2915.2003.00420.x

Alexandre-Pires G, Pais D, Correia M, Esperança Pina JA. Leishmaniosis - A report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. *Microsc Res Tech* 2006;69:227–235. doi:10.1002/jemt.20267.

Almeida ABPF, Sousa VRF, Gasparetto ND, Da Silva GFR, Figueiredo FB, Dutra V, et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;76:321–4. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.017.

Almeida PS, Minzão ER, Minzão LD, da Silva RS, Ferreira AD, Faccenda O et al. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010;43(6):723–727. doi: 10.1590/S0037-86822010000600025

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004;57:1–88. doi:10.1016/S0065-308X(04)57001-X.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLoS One 2012;7(5):e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671.

Alves EB, Figueiredo FB, Rocha MF, Werneck GL. Operational difficulties in the use of insecticidal dog collars for the control of visceral leishmaniasis, municipality of Montes Claros, MG, Brazil, 2012. Epidemiol Serv Saude 2018;27(4):e2017469. doi: 10.5123/S1679-49742018000400001.

Amusategui I, Sainz A, Rodríguez F, Tesouro MA. Distribution and Relationships between Clinical and Biopathological Parameters in Canine Leishmaniasis. Eur J Epidemiol 2013;18(2):147–156. doi: 10.1023/a:1023090929302

Andrade HM, Toledo VPCP, Pinheiro MB, Guimarães TMPD, Oliveira NC, Castro JA, et al. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. Vet Parasitol 2011;181:83–90. doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.009.

Aschar M, de Oliveira ETB, Laurenti MD, Marcondes M, Tolezano JE, Hiramoto RM, et al. Value of the oral swab for the molecular diagnosis of dogs in different stages of infection with *Leishmania infantum*. Vet Parasitol 2016;225:108–113. doi:10.1016/j.vetpar.2016.06.005.

Bagues NCT, Pinheiro CGM, Bastos LA, Fraga DBM, Veras PST, Pontes-de-Carvalho LC, et al. Parasitic load and histological aspects in different regions of the spleen of dogs with visceral leishmaniasis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2018;56:14-19. doi: 10.1016/j.cimid.2017.11.003.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis : part one. Trends Parasitol 2008;24:324–330. doi:10.1016/j.pt.2008.04.001.

Bañuls AL, Bastien P, Pomares C, Arevalo J, Fisa R, Hide M. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. Clin Microbiol Infect 2011;17:1451–1461. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03640.x.

Barata RA, Peixoto JC, Tanure A, Gomes ME, Apolinário EC, Bodevan EC, et al. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in a Reemerging Focus of Intense Transmission in Minas Gerais State , Brazil. Biomed Res Int. 2013;2013:405083. doi: 10.1155/2013/405083

Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2006;28:329–337. doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00840.x.

Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, Trigo J, Aguiar PH, dos-Santos WL, Pontes-de-Carvalho L, et al. Comparison between Splenic and Lymph Node Aspirations as Sampling Methods for the Parasitological Detection of *Leishmania chagasi* Infection in Dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004 Mar;99(2):195-7. doi: 10.1590/s0074-02762004000200014

Bates PA. Revising *Leishmania's* life cycle. *Nat Microbiol* 2018;3:529–530. doi:10.1038/s41564-018-0154-2.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 2007;37(10):1097-1106. doi:10.1016/j.ijpara.2007.04.003.

Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BW, da Silva ES, et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas : A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(4):e2182. doi: 10.1371/journal.pntd.0002182.

Benkova I, Volf P. Effect of Temperature on Metabolism of *Phlebotomus papatasi* (Diptera : Psychodidae) *J Med Entomol* 2007;44(1):150-154. doi: 10.1093/jmedent/41.5.150

Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal Clin Microbiol* 2006;44:1435–1439. doi:10.1128/JCM.44.4.1435.

Blavier A, Keroack S, Denerolle P, Goy-Thollot I, Chabanne L, Cadoré JL, et al. Atypical Forms of Canine Leishmaniosis. *Vet J* 2001;162:108–120. doi:10.1053/tvjl.2000.0556.

Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, et al. Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5(4):e1019. doi: 10.1371/journal.pntd.0001019.

Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J Vet Diagn Invest*. 1997;9:439–440. doi:10.1177/104063879700900421.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2014. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_viscerai\\_1edicao.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerai_1edicao.pdf) Acesso em: 05 de setembro de 2019.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2017. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf) Acesso em: 05 de setembro de 2019.

Brazil RP. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(3):263-264. doi: 10.1590/0037-8682-0101-2013.

Brianti E, Gaglio G, Napoli E, Falsone L, Prudente C, Solari Basano F, et al. Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors* 2014;7:327. doi: 10.1186/1756-3305-7-327.

Cardoso L, Pennisi MG, Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis , clinical staging , treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2009;165(1-2):1-18. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022.

Cardoso MJL, Machado LHA, Melussi M, Zamarian TP, Carnielli CM, Júnior JCMF. Dermatopatias em cães: Revisão de 257 casos. *Arch Vet Sci* 2011;16(2):66–74. doi:10.5380/avs.v16i2.18482

Carson C, Quinnell RJ, Holden J, Garcez LM, Deborggraeve S, Courtenay O. Comparison of *Leishmania* OligoC-TesT PCR with Conventional and Real-Time PCR for Diagnosis of Canine *Leishmania* Infection. *J Clin Microbiol* 2010;48:3325–3330. doi:10.1128/JCM.02331-09.

Carvalho GML, Filho JDA, Falcão AL, Lima ACVMR, Gontijo CMF. Naturally Infected *Lutzomyia* Sand Flies in a *Leishmania*-Endemic Area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008;8(3):407-414. doi: 10.1089/vbz.2007.0180.



Castellanos-Gonzalez A, Saldarriaga OA, Tartaglino L, Gacek R, Temple E, Sparks H, et al. A Novel Molecular Test to Diagnose Canine Visceral Leishmaniasis at the Point of Care. *Am J Trop Med Hyg* 2015;93:970–975. doi:10.4269/ajtmh.15-0145.

Cavalcanti AS, Ribeiro-Alves M, Pereira L de O, Mestre GL, Ferreira AB, Morgado FN, et al. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123009. doi: 10.1371/journal.pone.0123009.

Cavalcanti AS, Ribeiro-Alves M, Pereira L de O, Mestre GL, Ferreira AB, Morgado FN, et al. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. *PLoS One* 2015;10(4):e0123009. doi: 10.1371/journal.pone.0123009.

Cerino DA, Teodoro U, Silveira TGV. Sand Flies (Diptera : Psychodidae) in the Urban Area of the Municipality of Cianorte , Paraná State , Brazil. *Neotrop Entomol* 2009;38:853–8. doi: 10.1590/S1519-566X2009000600021.

Chamizo C, Moreno J, Alvar J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;103:67–75. doi:10.1016/j.vetimm.2004.08.010.

Choudhury K, Zander D, Kube M, Reinhardt R, Clos J. Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to miltefosine and SbIII. *Int J Parasitol* 2008;38(12):1411–1423. doi:10.1016/j.ijpara.2008.03.005.

Ciaramella P, Oliva G, Luna R De, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 1997;141(21):539-43. doi: 10.1136/vr.141.21.539.

Coelho EAF, Alberto C, Tavares P, Carvalho A, Chaves KF, Teixeira KN, et al. Immune Responses Induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 Antigen , but Not by the LACK Antigen , are Protective against Experimental *Leishmania ( Leishmania ) amazonensis* Infection. *Infect Immun* 2003;71:3988–94. doi:10.1128/IAI.71.7.3988.

Cortes S, Rolao N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98, (1): 12-17. doi: 10.1016/s0035-9203(03)00002-6

Costa CHN, Pereira HF, Araújo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Rev de Saúde Pública* 1990;24(5):361-372.doi:10.1590/S0034-89101990000500003.

Costa CHN. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? a critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011;44:232–242. doi:10.1590/s0037-86822011005000014.

Costa FA, Goto H, Saldanha LC, Silva SM, Sinhorini IL, Silva TC, et al. Histopathologic Patterns of Nephropathy in Naturally Acquired Canine Visceral Leishmaniasis *Vet Pathol* 2003;40(6):677-684. doi:10.1354/vp.40-6-677

Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Leal GG, Moreira Nd, et al. Evaluation of Change in Canine Diagnosis Protocol Adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a New Proposal for Diagnosis. *PLoS One* 2014;9(3):e91009. doi:10.1371/journal.pone.0091009.

Coura-Vital W, Reis AB, Fausto MA, Leal GG, Marques MJ, Veloso VM, Carneiro M. Risk factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from an endemic area of Brazil. *PLoS One* 2013;8, (8): e71833. doi: 10.1371/journal.pone.0071833

Courtenay O, Carson C, Calvo-bado L, M. Garcez L, J. Quinnell R. Heterogeneities in *Leishmania infantum* Infection: Using Skin Parasite Burdens to Identify Highly Infectious Dogs. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8:e2583. doi:10.1371/journal.pntd.0002583.

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ. Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. *J Infect Dis* 2002;186(9):1314–1320. doi: 10.1086/344312.

Cupolillo E, Boité MC, Porrozzi R. Considerações sobre a Taxonomia do Gênero *Leishmania*. *In:Conceição-Silva, F. Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014, p. 39–51.

CUPOLILLO E, GRIMALDI G JR, MOMEN H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50: 269-311 doi: 10.4269/ajtmh.1994.50.296

Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today* 2000; 16: 142–144. doi: 10.1016/s0169-4758(99)01609-9

da Costa-Val AP, Cavalcanti RR, de Figueiredo Gontijo N, Michalick MS, Alexander B, Williams P, et al. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity *Adriane*. *Vet J* 2007;174:636–643. doi:10.1016/j.tvjl.2006.11.006.

da Silva AVA, Figueiredo FB, Menezes RC, Mendes-Junior AA, de Miranda LHM, Cupolillo E, et al. Morphophysiological changes in the splenic extracellular matrix of *Leishmania infantum*- naturally infected dogs is associated with alterations in lymphoid niches and the CD4+ T cell frequency in spleens. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12(4):e0006445. doi: 10.1371/journal.pntd.0006445.

da Silva KR, de Mendonça VRR, Silva KM, do Nascimento LFM, Mendes-Sousa AF, De Pinho FA, et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2017;112:53–62. doi:10.1590/0074-02760160305.

da Silva VO, Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, de Souza EP, Luz KG, Palatnik M, 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 Amaranto, RN). *Vaccine* 2000;19:1082–1092. doi:10.1016/S0264-410X(00)00339-X.

Daher RK, Stewart G, Boissinot M, Bergeron MG. Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications *Clin Chem*. 2016;62(7):947-958. doi: 10.1373/clinchem.2015.245829.

Dantas-Torres F, Sales KGS, da Silva LG, Otranto D, Figueredo LA. Level of agreement between two commercially available rapid serological tests and the official screening test used to detect *Leishmania* seropositive dogs in Brazil. *Vet J*. 2018;234:102-104. doi: 10.1016/j.tvjl.2018.02.007.

Dantas-Torres F, Solano-gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, Paiva-Cavalcanti M de, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds : unveiled similarities and differences. Trends Parasitol 2012;28:531–538. doi:10.1016/j.pt.2012.08.007.

Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Vet Parasitol 2007;149:139–146. doi:10.1016/j.vetpar.2007.07.007.

Davoust B, Roqueplo C, Parzy D, Watier-Grillot S, Marié J-L. A twenty-year follow-up of canine leishmaniosis in three military kennels in southeastern France. Parasit Vectors. 2013;6(1):323. doi: 10.1186/1756-3305-6-323.

De Almeida A do B, Sousa VR, Da Cruz FA, Dahroug MA, Figueiredo FB, Madeira M de F. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiaba, Mato Grosso, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 2012;21(4): 359-365. doi: 10.1590/s1984-29612012005000005

de Carvalho FLN, Bello GL, Gehlen M, Rossetti MLR, Riboldi EDO, Dallegrave E, et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: A comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. Epidemiol Infect 2018;146:571–6. doi:10.1017/S0950268818000225.

de Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MSM. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. Vet Parasitol 2006;137:159–67. doi:10.1016/j.vetpar.2005.12.011.

de Oliveira GM, Madeira M de F, Oliveira FS, Pires MQ, Pacheco R da S. Canine Cutaneous Leishmaniasis : Dissemination and Tissue Tropism of Genetically Distinct *Leishmania ( Viannia ) braziliensis* Populations. Vet Med Int 2013;982183. doi: 10.1155/2013/982183.

de Pita-Pereira D, Cardoso MA, Alves CR, Brazil RP, Britto C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera : Psychodidae : Phlebotominae ) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. Acta Trop 2008;107(1):66-9. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.04.015.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89, (3): 463-469. doi: 10.1590/s0074-02761994000300032

Desjeux P, Alvar J. Leishmania /HIV co-infections: epidemiology in Europe . Ann Trop Med Parasitol 2003;97:3–15. doi:10.1179/000349803225002499.

Doehl JSP, Bright Z, Dey S, Davies H, Magson J, Brown N, et al. Skin parasite landscape determines host infectiousness in visceral leishmaniasis. Nat Commun. 2017;8(1):57. doi: 10.1038/s41467-017-00103-8.

dos Santos Nogueira F, Avino VC, Galvis-Ovallos F, Pereira-Chioccola VL, Moreira MAB, Romariz APPL. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. Parasit Vectors 2019;12(1):79. doi: 10.1186/s13071-019-3323-0.

dos Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hofmann M de P, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. Med Vet Entomol 1998;12:315–317. doi: 10.1046/j.1365-2915.1998.00104.x

Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. Parasit Vectors 2012;5:276. doi: 10.1186/1756-3305-5-276.

Eresh S, McCallum SM, Barker DC. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. Parasitology 1994;109(4): 423-433. doi: 10.1017/s0031182000080677

Espinosa OA, Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MMG, Shaw JJ. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitol 2016; 15: 1-13. doi: 10.1017/S0031182016002092.

Farca AM, Miniscalco B, Badino P. Canine leishmaniosis: in vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum* Parasitol Res. 2012;110(6):2509-13. doi: 10.1007/s00436-011-2792-7.

Faria AR, Andrade, HM de. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. Rev Pan-Amaz Saude 2012;3(2):47-57. doi:10.5123/S2176-62232012000200007.

Fernandes CB, Junior JTM, De Jesus C, Da Silva Souza BMP, Larangeira DF, Fraga DBM, 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 2014;32:1287–95. doi:10.1016/j.vaccine.2013.12.046.

Ferreira E de C, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES da, et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* 2007;146:235–41. doi:10.1016/j.vetpar.2007.02.015.

Ferrer L, Rabanal RM, Domingo M, Ramos JA, Fondevila D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res Vet Sci*. 1988;44(2):194-196. doi: 10.1016/S0034-5288(18)30838-5

Figueiredo FB, Vasconcelos T, Madeira MF, Menezes RC, Maia-Elkhoury A, Marcelino AP, Werneck GL. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2018;113(11):e180260. doi:10.1590/0074-02760180260

Fraga DB, Pacheco LV, Borja LS, Tuy PG, Bastos LA, Solcà Mda S, et al. The Rapid Test Based on *Leishmania infantum* Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10(1):e0004333. doi: 10.1371/journal.pntd.0004333.

Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2006;137:214–21. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.011.

Furtado MC, Menezes RC, Kiupel M, Madeira MF, Oliveira RV, Langohr IM, Figueiredo FB. Comparative study of in situ hybridization, immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors* 2015;8:620. doi: 10.1186/s13071-015-1224-4

Gao CH, Ding D, Wang JY, Steverding D, Wang X, Yang YT, et al. Development of a LAMP assay for detection of *Leishmania infantum* infection in dogs using conjunctival swab samples. *Parasites and Vectors* 2015;8:1–8. doi:10.1186/s13071-015-0991-2.

Gharbi M, Mhadhbi M, Rejeb A, Jaouadi K, Rouatbi M, Darghouth MA. Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. *Rev Sci Tech*. 2015;34(2):613-26. doi:10.20506/rst.34.2.2384.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM. Relationship between Canine Visceral Leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in Dermal Inflammatory Foci. *J Comp Pathol* 2006;135(2-3):100-107. doi: 10.1016/j.jcpa.2006.06.005.

Gomes RB, Mendonça IL, Silva VC, Ruas J, Silva MB, Cruz MS, et al. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi* *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101(2):127-33.

Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Gascón M, Zarate JJ, Alvarez F, Couto CG. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. *Vet J* 2009;179:259–63. doi:10.1016/j.tvjl.2007.09.014.

Gray MA, Pratte ZA, Kellogg CA. Comparison of DNA preservation methods for environmental bacterial community samples. *FEMS Microbiol Ecol* 2013;83:468–77. doi:10.1111/1574-6941.12008.

Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews* 1993;6(3): 230-250. doi: 10.1128/cmr.6.3.230

Grimaldi Jr. G, Teva A, B. dos-Santos C, Nunes Santos F, de-Souza Pinto I, Fux B, 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* 2017;12:e0185438. doi:doi.org/10.1371/ journal.pone.0185438.

Grimaldi Jr. G, Teva A, Santos CB, Ferreira AL, Falqueto A. The Effect of Removing Potentially Infectious Dogs on the Numbers of Canine *Leishmania infantum* Infections in an Endemic Area with High Transmission Rates. *Am J Trop Med Hyg* 2012;86:966–71. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0040.

Guarga L, Lucientes J, Periba MA. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Trop* 2000;77(2):203-7. doi: 10.1016/S0001-706X(00)00141-8

Guebouj S, Djilani F, Bettaieb J, Lambson B, Diouani MF, Ben Salah A, et al. Evaluation of a gp63-PCR based assay as a molecular diagnosis tool in canine Leishmaniasis in Tunisia. *PLoS One.* 2014; 9(8): e105419 . doi:10.1371/journal.pone.0105419.

Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Henrique C, Costa N. Urban parasitology : visceral leishmaniasis in Brazil. Trends Parasitol 2011;27:403–9. doi:10.1016/j.pt.2011.04.001.

Hosein S, Rodríguez-Cortés A, Blake DP, Allenspach K, Alberola J, Solano-Gallego L, et al. Transcription of Toll-Like Receptors 2, 3, 4 and 9, FoxP3 and Th17 Cytokines in a Susceptible Experimental Model of Canine *Leishmania infantum*. PLoS One. 2015;10(10):e0140325. doi: 10.1371/journal.pone.0140325.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Panorama de Governador Valadares. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/governador-valadares/panorama> Acesso em: 19 de dezembro de 2019.

Juttner C, Sanchez MR, Landeras ER, Slappendel RJ, Arnold CF. Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. Vet Rec 2001;49(6):176-9. doi: 10.1136/vr.149.6.176.

Kato H, Cáceres AG, Mimori T, Ishimaru Y, Sayed ASM, Fujita M, et al. Use of FTA Cards for Direct Sampling of Patients' Lesions in the Ecological Study of Cutaneous Leishmaniasis. J Clin Microbiol 2010;48:3661–5. doi:10.1128/JCM.00498-10.

Kazimoto TA, Amora SSA, Figueiredo FB, Magalhães JM e, Freitas YBN, Sousa MLR, et al. Impact of 4% Deltamethrin-Impregnated Dog Collars on the Prevalence and Incidence of Canine Visceral Leishmaniasis. Vector-Borne Zoonotic Dis 2018;18:356–63. doi:10.1089/vbz.2017.2166.

Khan MGM, Bhaskar KRH, Salam MA, Akther T, Pluschke G, Mondal D. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. Parasit Vectors 2012;5:280. doi: 10.1186/1756-3305-5-280.

Koutinas A, Polizopoulou Z, Saridomichelakis M, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki K. Clinical Considerations on Canine Visceral Leishmaniasis in Greece : A Retrospective Study of 158 Cases ( 1989 – 1996 ). J Am Anim Hosp Assoc 1999;35:376–383.doi: 10.5326/15473317-35-5-376

Kreutzer RD, Grogl M, Neva FA, Fryauff DJ, Magill AJ, Aleman-Munoz MM. Identification and genetic comparison of leishmanial parasites causing viscerotropic and cutaneous disease in



soldiers returning from Operation Desert Storm. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49(3): 357-363. doi: 10.4269/ajtmh.1993.49.357

Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:1155. doi:10.1371/journal.pntd.0001155.

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis , with particular reference to Brazil - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100(8):811-827. doi: 10.1590/s0074-02762005000800001

Lainson R, Ryan L, Shaw JJ. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987;82(3):421-424. doi: 10.1590/s0074-02761987000300015

Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74. doi: 10.2307/2529310,

Larson M, Toepp A, Scott B, Kurtz M, Fowler H, Esfandiari J, et al. Semi-quantitative measurement of asymptomatic *L. infantum* infection and symptomatic visceral leishmaniasis in dogs using Dual-Path Platform® CVL. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017;101(1):381-390. doi: 10.1007/s00253-016-7925-6.

Laurenti MD, de Santana Leandro MV Jr, Tomokane TY, De Lucca HR, Aschar M, Souza CS, et al. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2014;205(3-4):444-450. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.09.002.

Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VL, Tomokane TY, Corbett CE, Secundino NF, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol* 2013;196:296-300. doi:10.1016/j.vetpar.2013.03.017.

LEAL GG de A. Efetividade da coleira impregnada com deltametrina na redução da incidência da leishmaniose visceral canina. Ouro Preto. Tese [Doutorado em Ciências Biológicas] - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto; 2017.

Leite de Sousa-Gomes M, Romero GAS, Werneck GL. Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: Are we aware enough? PLoS Negl Trop Dis. 2017;25;11(9):e0005772. doi: 10.1371/journal.pntd.0005772.

Leite RS, Ferreira S de A, Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade ASR. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. Vet Parasitol 2010;170:201–206. doi:10.1016/j.vetpar.2010.02.020.

Leite RS, Ferreira Sde A, Ituassu LT, De Melo MN, De Andrade AS. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. Vet Parasitol 2010;70(3-4): 201-206. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.02.020

Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD, et al. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. Vet Parasitol 2002;109:19–27. doi:10.1016/S0304-4017(02)00201-7.

Lima IS, Silva JS, Almeida VA, Leal Junior FG, Souza PAN, Larangeira DF, et al. Severe Clinical Presentation of Visceral Leishmaniasis in Naturally Infected Dogs with Disruption of the Splenic White Pulp. Plos One 2014;9:e87742. doi:10.1371/journal.pone.0087742.

Lima WG, Michalickb MSM, Melo MN de, Tafuri Washington Luiz, Tafuri Wagner Luiz. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. Acta Trop 2004;92:43–53. doi:10.1016/j.actatropica.2004.04.007.

Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Migliazzo A, Caprì A, Solano-Gallego L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. Vet Parasitol 2012;184:10–17. doi:10.1016/j.vetpar.2011.08.010.

Lopes EG, Sevá AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB, Hiramoto RM, et al. Vaccine effectiveness and use of collar impregnated with insecticide for reducing incidence of *Leishmania* infection in dogs in an endemic region for visceral leishmaniasis, in Brazil. Epidemiol Infect 2019;146:401–6. doi:10.1017/S0950268817003053.

Lopes EG, Sevá AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB, Hiramoto RM, et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: One out

of five seronegative dogs are infected. *Epidemiol Infect* 2017;145:2436–2444. doi:10.1017/S0950268817001443.

Loria-Cervera EN, Sosa-Bibiano EI, Van Wynsberghe NR, Saldarriaga OA, Melby PC, Andrade-Narvaez FJ. Cytokine mRNA expression in *Peromyscus yucatanicus* (Rodentia: Cricetidae) infected by *Leishmania (Leishmania) mexicana*. *Cytokine* 2016;83:176–181. doi:10.1016/j.cyto.2016.04.016.

Madeira M de F, Schubach A de O, Schubach TM, Leal CA, Marzochi MC. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* Isolated from Healthy Skin of Symptomatic and Asymptomatic Dogs Seropositive for Leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro , Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2004;8(6):440-444. doi:S1413-86702004000600008

Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AG, Nascimento LD, Furtado M, Mouta-Confort E, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis : Is intact skin a good target ? *Res Vet Sci* 2009;87:260–262. doi:10.1016/j.rvsc.2009.03.008.

Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 2008;158(4): 274-287. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.07.028

Manna L, Reale S, Vitale F, Gravino AE. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci* 2009;87:76–78. doi:10.1016/j.rvsc.2008.12.009.

Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2004;125, (3-4): 251-262. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.07.019

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol* 2013;27:123–147. doi:10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x.

Maroli M, Gradoni L, Oliva G, Castagnaro M, Crotti A, Lubas G, et al. Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2010;236:1200–1206. doi:10.2460/javma.236.11.1200.

Martínez Abad LP, Almeida CS, Mattos AMM, Mendonça ACP, Alves MJM, Pinheiro AC, et al. Diagnostic accuracy of rKLO8 versus rK26 ELISAs for screening of canine visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 2017;166:133-138. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.11.021.

Martins KA. Comportamento alimentar de dípteros vetores de patógenos e estudo da expressão de proteínas de choque térmico (HSP 70 e 90) de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Phlebotominae) frente a diferentes estresses relacionados à hematofagia. Tese [Doutorado em Parasitologia] - Universidade Federal de Minas Gerais; 2015.

McClure MC, McKay SD, Schnabel RD, Taylor JF. Assessment of DNA extracted from FTA cards for use on the Illumina iSelect BeadChip. *BMC Res Notes* 2009;2:107. doi: 10.1186/1756-0500-2-107.

Mendonça IL de, Batista JF, Werneck GL, Soares MRA, Costa DL, Costa CHN. Serological tests fail to discriminate dogs with visceral leishmaniasis that transmit *Leishmania infantum* to the vector *Lutzomyia longipalpis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2017;50:483–488. doi:10.1590/0037-8682-0014-2017.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs. *J Clin Microbiol* 2005;43:5515–5519. doi:10.1128/JCM.43.11.5515-5519.2005.

Michalsky ÉM, Rocha MF, da Rocha Lima ACVM, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol* 2007;147:67–76. doi:10.1016/j.vetpar.2007.03.004.

Ministério da Agricultura. Nota Técnica N° 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA. Processo N° 21000.042544/2016-94; 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/notas-tecnicas/nota-tecnica-no-11-2016-cpv-dfip-sda-gm-mapa-de-1-09-2016.pdf/view> Acesso em: 05 de setembro de 2019.

- Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral 2017; 2017. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/leishvisceral-17-novo-layout.pdf> Acesso em: 05 de setembro de 2019.
- Miró G, Cardoso L, Grazia Pennisi M, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol* 2008;24:371–377. doi:10.1016/j.pt.2008.05.003.
- Miró G, Oliva G, Cruz I, Canavate C, Mortarino M, Vischer C, et al. Multicentric , controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Vet Dermatol* 2009;20:397–404. doi:10.1111/j.1365-3164.2009.00824.x.
- Mohammadiha A, Haghighi A, Mohebbali M, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, et al. Canine visceral leishmaniasis: A comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. *Vet Parasitol* 2013;192:83–90. doi:10.1016/j.vetpar.2012.10.013.
- Mohammadiha A, Mohebbali M, Haghighi A, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, Yeganeh F, Kazemi B, Taghipour N, Akhound B. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. *Exp Parasitol* 2013; 133, (1): 89-94. doi: 10.1016/j.exppara.2012.10.017
- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88(4):491-3. doi: 10.1016/0035-9203(94)90446-4.
- Mondelaers A, Sanchez-Cañete MP, Hendrickx S, Eberhardt E, Garcia-Hernandez R, Lachaud L, et al. *Leishmania infantum* Strains with Either Natural or Acquired Resistance through Experimental Selection of Intracellular Amastigotes. *PLoS One* 2016;11:154101. doi:10.1371/journal.pone.0154101.
- Morales MA, Chicharro C, Ares M, Canavate C, Barker DC, Alvar J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95, (1): 104-107. doi: 10.1016/s0035-9203(01)90352-9

Moreira M, Luvizotto M, Garcia J, Corbett C, Laurenti M. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol.* 2007;145(3-4):245-252. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.12.012.

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Nunes CM, Silva TCC, Laurenti MD, Corbett CEP. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2002;39(2):103-106. <https://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962002000200009>

Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis : epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 2002;18(9):399-405. doi: 10.1016/S1471-4922(02)02347-4

Morgado FN, Cavalcanti AD, Miranda LH, O'Dwyer LH, Silva MR, Menezes RC. *Hepatozoon canis* and *Leishmania* spp. coinfection in dogs diagnosed with visceral leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Veterinária* 2016;25:450–8. doi:10.1590/S1984-29612016065.

Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother* 2009;15:62–69. doi:10.1007/s10156-009-0669-9.

Mylonakis ME, Papaioannou N, Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet Clin Pathol* 2005;34:243–247. doi: 10.1111/j.1939-165X.2005.tb00048.x

Naranjo C, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Pen T. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2005;133(1):37-47. doi:10.1016/j.vetpar.2005.05.017.

Nascimento MS, Albuquerque TD, Do-Valle-Matta MA, Caldas IS, Diniz LF, Talvani A, et al. Naturally *Leishmania infantum*-infected dogs display an overall impairment of chemokine and chemokine receptor expression during visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2013;153:202–208. doi:10.1016/j.vetimm.2013.02.015.

Nascimento MSL, Albuquerque TDR, Nascimento AFS, Caldas IS, Do-Valle-Matta MA, Souto JT, et al. Impairment of Interleukin-17A Expression in Canine Visceral Leishmaniosis is Correlated with Reduced Interferon- $\gamma$  and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression. *J Comp Pathol* 2015;153:197–205. doi:10.1016/j.jcpa.2015.10.174.

Nieto CG, Navarrete I, Habela MA, Serrano F, Redondo E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 1992;45:33–47. doi: 10.1016/0304-4017(92)90025-5

Noli C, Auxilia ST. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol* 2005;16:213–232. doi: 10.1111/j.1365-3164.2005.00460.x

Nunes CM, de Lima VM, de Melo GD, de Paula HB, Pereira ME, Tronco C de M, et al. Serological, parasitological and molecular tests for canine visceral leishmaniasis diagnosis in a longitudinal study. *Rev Bras Parasitol Vet* 2015;24(4):402-9. doi: 10.1590/S1984-29612015073.

Nunes CM, Lima VMF de, Paula HB de, Perri SHV, Andrade AM de, Dias FEF, et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 2008;153:19–23. doi:10.1016/j.vetpar.2008.01.005.

Oliveira VVG, Alves LC, Silva Junior, VA. Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. *Ciência Rural* 2015;45(9):1622-1628. doi:10.1590/0103-8478cr20141368

Ordeix L, Solano-Gallego L, Fondevila D, Ferrer L, Fondati A. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp . infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. *Vet Dermatol* 2005;16(3):187-91. doi: 10.1111/j.1365-3164.2005.00454.x

Otranto D, Dantas-Torres F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol* 2013;29:339–45. doi:10.1016/j.pt.2013.05.003.

Otranto D, de Caprariis D, Lia RP, Tarallo V, Lorusso V, Testini G, et al. Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: A longitudinal field study. *Vet Parasitol* 2010;172:323–32. doi:10.1016/j.vetpar.2010.05.017.

Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2001;219(8):1076-1083. doi: 10.2460/javma.2001.219.1076

Paiva BR, Secundino NFC, Nascimento JC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade Junior HF, et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop* 2006;99:252–259. doi:10.1016/j.actatropica.2006.08.009.

- Paltrinieri S, Gradoni L, Roura X, Zatelli A, Zini E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Vet Clin Pathol* 2016;45:552–578. doi:10.1111/vcp.12413.
- Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2010;236:1184–1191. doi:10.2460/javma.236.11.1184.
- Pangrazio KK, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TMA, Paixão TA, et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet Parasitol* 2009;165:327–331. doi:10.1016/j.vetpar.2009.07.013.
- Papadogiannakis EI, Koutinas AF, Saridomichelakis MN. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Immunol Immunopathol* 2005;104(3-4):227-237. doi:10.1016/j.vetimm.2004.12.001.
- Paz GF, Rugani JMN, Marcelino AP, Gontijo CMF. Implications of the use of serological and molecular methods to detect infection by *Leishmania* spp. in urban pet dogs. *Acta Trop*. 2018;182:198-201. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.03.018.
- Peixoto HM, de Oliveira MRF, Romero GAS. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil : systematic review and meta-analysis. *Trop Med Int Heal* 2015;20:334–352. doi:10.1111/tmi.12429.
- Pena MT, Roura X, Davidson MG. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs : 105 cases ( 1993 ± 1998 ). *Vet Ophthalmol* 2000;3:35–41. doi: 10.1046/j.1463-5224.2000.00106.x
- Pimenta PFP, Modi GB, Pereira M, Shahabuddin M, Sacks DL. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* 1997;115 ( Pt 4):359-69. doi: 10.1017/s0031182097001510
- Pineda C, Aguilera-Tejero E, Morales MC, Belinchon-Lorenzo S, Gomez-Nieto LC, Garcia P, et al. Treatment of canine leishmaniasis with marbofloxacin in dogs with renal disease . *PLoS One* 2017;12(10):e0185981. doi: 10.1371/journal.pone.0185981.



Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenbergh J. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 1994;62(1):229-35. doi:10.0000/iai.asm.org/iai/62/1/229

Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BA, Moreira OC, et al. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniases. *Parasit Vectors* 2012;5:15. doi: 10.1186/1756-3305-5-15.

Porrozzini R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14(5):544-548. doi: 10.1128/CVI.00420-06

Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect* 2007;9:1307–1315. doi:10.1016/j.micinf.2007.06.005.

Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C. The epidemiology of canine leishmaniasis: Transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology* 1997;115:143–156. doi:10.1017/S0031182097001200.

Quinnell RJ, Carson C, Reithinger R, Garcez LM, Courtenay O. Evaluation of rK39 Rapid Diagnostic Tests for Canine Visceral Leishmaniasis: Longitudinal Study and Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:e1992. doi:10.1371/journal.pntd.0001992.

Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, et al. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology* 2001;122:253–261. doi:10.1017/S0031182001007363.

Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C. The epidemiology of canine leishmaniasis: Transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology* 1997;115:143–156. doi:10.1017/S0031182097001200.

Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2003;91:161–168. doi:10.1016/S0165-2427(02)00311-2.

Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw M, Day MJ, Garcez LM, Dye C, et al. Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis* 2001;183(9):1421-4 doi: 10.1086/319869

Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, Kaye PM. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J.Infect.Dis* 2001;183, (9): 1421-1424. doi: 10.1086/319869

Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis *Parasitology* 2009;136(14):1915-1934. doi: 10.1017/S0031182009991156.

Rallis T, Day MJ, Saridomichelakis MN, Papazoglou L, Fytianou A, Koutinas AF. Chronic Hepatitis Associated with Canine Leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a Clinicopathological Study of 26 Cases. *J Comp Pathol* 2005;132(2-3):145-52. doi:10.1016/j.jcpa.2004.09.004.

Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF, Andrade CA. Biology of *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 and *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), under experimental conditions. I. Feeding aspects of larvae and adults. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986;81(4):431-8. doi:10.1590/s0074-02761986000400010

Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in Dogs by PCR with Lymph Node Aspirates and Blood. *J Clin Microbiol* 1999;37(9):2931-2935. doi: 10.0000/jcm.asm.org/jcm/37/9/2931

Regina-Silva S, Feres AMLT, França-Silva JC, Dias ES, Michalsky ÉM, de Andrade HM, 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* 2016;34:2233–2239. doi:10.1016/j.vaccine.2016.03.019.

Reis AB, Giunchetti RC, Carrillo E, Martins-Filho OA, Moreno J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2010;26:341–349. doi:10.1016/j.pt.2010.04.005.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2009;128:87–95. doi:10.1016/j.vetimm.2008.10.307.

Reithinger R, Coleman PG, Alexander B, Vieira EP, Assis G, Davies CR. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *Int J Parasitol* 2004;34:55–62. doi:10.1016/j.ijpara.2003.09.006.

Resende DM, Caetano BC, Dutra MS, Penido MLO, Abrantes CF, Verly RM, et al. Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: Correlation with IFN- $\gamma$  and cytolytic activity by CD8+ T cells. *Vaccine* 2008;26:4585–4593. doi:10.1016/j.vaccine.2008.05.091.

Ribeiro RR, Suzan M, Michalick M, Da Silva ME, Peixoto CC, Santos D, et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *Biomed Res Int* 2018;2018:3296893. doi: 10.1155/2018/3296893.

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 1990;71:267–275. doi:10.1016/0014-4894(90)90031-7.

Rodríguez-Cortés A, Carrillo E, Martorell S, Todolí F, Ojeda A, Martínez-Flórez A, et al. Compartmentalized Immune Response in Leishmaniasis: Changing Patterns throughout the Disease *PLoS One* 2016;11(5):e0155224. doi: 10.1371/journal.pone.0155224.

Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, Francino O, López-Fuertes L, Timón M, Alberola J. *Leishmania* infection: Laboratory diagnosing in the absence of a “gold standard.” *Am J Trop Med Hyg* 2010;82:251–256. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0366.

Romero GAS, Boelaert M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America-A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e584. doi:10.1371/journal.pntd.0000584.

Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS. Transplacental Transmission of a North American Isolate of *Leishmania infantum* in an Experimentally Infected Beagle. *J Parasitol* 2005;91:970–972. doi:10.1645/GE-483R.1.

Roura X, Fondevila D, Sa A. Detection of *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies of dogs using polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 1999;11(4):385-7. doi: 10.1177/104063879901100420

Sabaté D, Llinás J, Homedes J, Sust M, Ferrer L. A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Prev Vet Med* 2014;115:56–63. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.03.010.

Saieg MA, Geddie WR, Boerner SL, Liu N, Tsao M, Zhang T, et al. The Use of FTA Cards for Preserving Unfixed Cytological Material for High-Throughput Molecular Analysis. *Cancer Cytopathol* 2012;120(3):206-14. doi: 10.1002/cncy.20205.

Saldarriaga OA, Castellanos-Gonzalez A, Porrozzi R, Baldeviano GC, Lescano AG, de Los Santos MB, et al. An Innovative Field-Applicable Molecular Test to Diagnose Cutaneous *Leishmania Viannia* spp. *Infections. PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:1–12. doi:10.1371/journal.pntd.0004638.

Salomon OD, Sinagra A, Nevot MC, Barberian G, Paulin P, Estevez JO, et al. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103:109–111. doi:10.1590/S0074-02762008000100018.

Santana CC, Vassallo J, de Freitas LA, Oliveira GG, Pontes-de-Carvalho LC, dos-Santos WL. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis : A study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol* 2008;30(10):515–524. doi:10.1111/j.1365-3024.2008.01051.x.

Saraiva EM, Pinto-da-silva LH, Luiz J, Wanderley M, Bonomo AC, Barcinski MA, et al. Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: validation by morphological features and specific markers. *Exp Parasitol* 2005;110(1):39-47. doi: 10.1016/j.exppara.2005.01.004

Saraiva L, Dilermando J, Filho A, Lima A, Aparecida D, Carvalho A De, et al. Phlebotominae fauna (Diptera : Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte , Brazil , endemic for visceral leishmaniasis : Characterization of favored locations as determined by spatial analysis. *Acta Trop* 2011;117:137–145. doi:10.1016/j.actatropica.2010.11.007.

Saraiva L, Leite CG, de Carvalho LO, Andrade Filho JD, de Menezes FC, Fiúza Vde O. Information System and Geographic Information System Tools in the Data Analyses of the Control Program for Visceral Leishmaniasis from 2006 to 2010 in the Sanitary District of Venda Nova , Belo Horizonte , Minas Gerais , Brazil. *J Trop Med* 2012;2012:254361. doi: 10.1155/2012/254361.

Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Evaluation Of Lymph Node And Bone Marrow Cytology In The Diagnosis Of Canine Leishmaniasis (*Leishmania Infantum*) In Symptomatic And Asymptomatic Dogs. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73(1):82-86. doi: 10.4269/ajtmh.2005.73.82

Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis : epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol* 2009;20:471–489. doi:10.1111/j.1365-3164.2009.00823.x.

Schallig HDFH, Schoone GJ, Beijer EGM, Kroon CCM, Hommers M, Özbel Y, et al. Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Vet Parasitol* 2002;109:1–8. doi:10.1016/S0304-4017(02)00268-6.

Schubach EYP, Figueiredo FB, Romero GAS. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2014;108:568–574. doi:10.1093/trstmh/tru109.

Serafim TD, Coutinho-abreu I V, Oliveira F, Meneses C, Kamhawi S, Valenzuela JG. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity *Nat Microbiol* 2018;3(5):548-555. doi: 10.1038/s41564-018-0125-7

Sevá AP, Ovallos FG, Amaku M, Carrillo E, Moreno J, Galati EAB, et al. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLoS One* 2016;11(7):e0160058. doi: 10.1371/journal.pone.0160058.

Sharma U, Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 2008;45(4):255-272

Shaw J. The leishmaniasis - Survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:541–546. doi: 10.1590/s0074-02762007000500001.

Silva F, Paulo L, Carvalho C. Sand Flies (Diptera : Psychodidae ) in a Cerrado area of the Maranhão State , Brazil. *Neotrop Entomol* 2010;39(6):1032-8. doi:10.1590/S1519-566X2010000600028.

Silva FL, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2009;160:55–59. doi:10.1016/j.vetpar.2008.10.079.

Silva LC, Castro RS, Figueiredo MM, Michalick MS, Tafuri WL, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. *Int J Exp Pathol* 2013;94(2):133-143. doi:10.1111/iep.12010.

Silva RAE, Andrade AJ, Quint BB, Raffoul GES, Werneck GL, Rangel EF, et al. Effectiveness of dog collars impregnated with 4 % deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae : Phlebotominae) populations. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2018;113:1–9. doi:10.1590/0074-02760170377.

Silva RC, Richini-Pereira VB, Kikuti M, Marson PM, Langoni H, Inia V, et al. Detection of *Leishmania (L.) infantum* in stray dogs by molecular techniques with sensitive species-specific primers. *Vet Q* 2017;37:23–30. doi:10.1080/01652176.2016.1252073.

Solano-Gallego L, Fernandez-Bellon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, et al. Histological and Immunohistochemical Study of Clinically Normal Skin of *Leishmania infantum* -infected Dogs. *J Comp Pathol* 2004;130:7–12. doi:10.1016/S0021-9975(03)00063-X.

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, G. Pennisi M, Ferrer L, et al. Veterinary Parasitology Directions for the diagnosis , clinical staging , treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2009;165:1–18. doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.022.

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, G. Pennisi M, Ferrer L, et al. Veterinary Parasitology Directions for the diagnosis , clinical staging , treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2009;165:1–18. doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.022.

Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Grazia Pennisi M, Ferrer L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors* 2011;4:86. doi:10.1186/1756-3305-4-86.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. J Clin Microbiol 2001;39:560–563. doi:10.1128/JCM.39.2.560-563.2001.

Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. Vet Parasitol 2007;147:315–319. doi:10.1016/j.vetpar.2007.04.013.

Solano-Gallego L, Villanueva-Saz S, Carbonell M, Trotta M, Furlanello T, Natale A. Serological diagnosis of canine leishmaniasis: Comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and *Leishmania* 96®), a rapid test (Speed Leish K®) and an in-house IFAT. Parasit Vectors 2014;7:1–10. doi:10.1186/1756-3305-7-111.

Solca Mda S, Guedes CE, Nascimento EG, Oliveira GG, Dos Santos WL, Fraga DB, Veras PS. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. Vet Parasitol 2012;184(2-4): 133-140. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.08.026

Sousa S, Lopes AP, Cardoso L, Silvestre R, Schallig H, Reed SG, et al. Seroepidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. Acta Trop 2011;120:82–87. doi:10.1016/j.actatropica.2011.06.003.

Souza TL de. Estudo dos marcadores de exaustão no baço de cães naturalmente infectados com *leishmania infantum*. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Parasitária] – Instituto Oswaldo Cruz; 2018.

Strauss-Ayali D, Baneth G, Jaffe CL. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. Vet Res 2007;38(4):547-564 doi:10.1051/vetres:2007015.

Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2002;9(5):951–958. doi: 10.1128/cdli.9.5.951-958.2002.

Tafuri WL, de Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. Vet Parasitol 2001;96:203–212. doi:10.1016/S0304-4017(00)00436-2.

Torres M, Bardagí M, Roura X, Zanna G, Ravera I, Ferrer L. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J* 2011;188:346–351. doi:10.1016/j.tvjl.2010.05.025.

Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, Miró G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12:1–13. doi:10.1371/journal.pntd.0006082.

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia : relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64(3-4):119-124. doi: 10.4269/ajtmh.2001.64.119

Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009; 164 (2-4): 118-123. doi:10.1016/j.vetpar.2009.06.027

Turchetti AP, Souza TD, Paixão TA, Santos RL. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8(4):403–407. doi:10.3855/jidc.4108

Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, Georgiadis G, Saridomichelakis M. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Rec* 2000;146(24):698-703. doi: 10.1136/vr.146.24.698.

Verçosa B, Lemos CM, Mendonça IL, Silva S, De Carvalho SM, Goto H, et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Vet Res* 2008;4:45. doi:10.1186/1746-6148-4-45.

Verma S, Avishek K, Sharma V, Negi NS, Ramesh V, Salotra P. Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75:390–395. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.01.011.

Vida B, Toepp A, Schaut RG, Esch KJ, Juelsgaard R, Shimak RM, Petersen CA. Immunologic progression of canine leishmaniosis following vertical transmission in United States dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016;169:34–38. doi:10.1016/j.vetimm.2015.11.008

Viol MA, Lima VMF, Aquino MCC, Gallo G, Alves IP, Generoso D, et al. Detection of cross infections by *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. in dogs using indirect immunoenzyme



assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 2012;111:1607–1613. doi:10.1007/s00436-012-2999-2.

Volf, P., Hostomska, J., Rohousova, I. Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite* 2008;15(3):237-43. doi: 10.1051/parasite/2008153237

Walters LL, Irons KP, Modi GB, Tesh RB. Refractory Barriers in the Sand Fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to Infection with *Leishmania Panamensis*. *Am J Trop Med Hyg* 1992;46:211–228. doi:10.4269/ajtmh.1992.46.211.

Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol Infect* 2007;135:195–201. doi:10.1017/S0950268806006881.

WHO (World Health Organization). Epidemiological situation. Disponível em: <https://www.who.int/yaws/epidemiology/en/> Acesso em:05 de setembro de 2019.

WHO (World Health Organization). Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> Acesso em:05 de setembro de 2019.

Wylie CE, Carbonell-Antoñanzas M, Aiassa E, Dhollander S, Zagnutt FJ, Brodbelt DC, et al. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: Vaccinations. *Prev Vet Med* 2014;117:7–18. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.06.015.

Yasur-Landau D, Jaffe CL, David L, Baneth G. Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:1–13. doi:10.1371/journal.pntd.0004341.



Zaffaroni E, Rubaudo L, Lanfranchi P, Mignone W. Epidemiological patterns of canine leishmaniosis in Western Liguria (Italy). *Vet Parasitol* 1999;81:11–19. doi: 10.1016/s0304-4017(98)00237-4

Zanette MF, Lima VM, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RF, et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014;47(1):105-7. doi: 10.1590/0037-8682-1723-2013.

Zanin FHC, Coelho EAF, Tavares CAP, Marques-da-Silva EA, Silva Costa MM, Rezende SA, et al. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes Infect* 2007;9:1070–1077. doi:10.1016/j.micinf.2007.05.012.

## 8. ANEXOS

### Anexo I. Ficha cadastral dos Animais

	<b>FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ</b> Instituto Oswaldo Cruz Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose	
---	---	---

<b>Ficha de Avaliação Clínica</b>	<b>Registro</b>	<b>Data de coleta</b> / /
-----------------------------------	-----------------	------------------------------

#### 1 – LOCAL DE COLETA

Nome: Cidade:

#### 2 – PROPRIETÁRIO DO ANIMAL

Nome:

Bairro: Cidade: Estado: Telefone:

#### 3 – ANIMAL

Nome: Sexo: ( )M ( )F Raça: ( )SRD ( )Outra: \_\_\_\_\_

Idade: Peso/porte: Score corporal:

Tipo de pelagem: ( )curta ( )longa Cor predominante da pelagem: \_\_\_\_\_

Logradouro: ( ) área rural ( ) área urbana

SINAIS CLÍNICOS				OBS.:
( ) Dermatite	( ) +	( ) ++	( ) +++	( ) Dermatite papular ( ) Dermatite exfoliativa ( ) Úlcera(s) na pele
( ) Onicogribose	( ) +	( ) ++	( ) +++	
( ) Conjuntivite/ Uveíte	( ) +	( ) ++	( ) +++	
( ) Emagrecimento	( ) +	( ) ++	( ) +++	( ) Anorexia ( ) Perda de peso (<20%) ( ) Perda de peso <sup>[ ]</sup> (>20%) <sub>[ ]</sub> ( ) Caquexia
( ) Alopecia	( ) +	( ) ++	( ) +++	( ) Local ( ) Generalizada
( ) Linfadenopatia	( ) +	( ) ++	( ) +++	
( ) Sangramento	( ) +	( ) ++	( ) +++	( ) Caquexia ( ) Epistaxe <sup>[ ]</sup> <sub>[ ]</sub> ( ) Sangramento de orifícios naturais
( ) Síndrome nefrotica (pu/pd)	( ) +	( ) ++	( ) +++	

#### 4 – RESULTADO

Teste	Data	Resultado	Teste	Data	Resultado
DPP	___/___/___	( ) neg ( ) pos			
qPCR Sangue	___/___/___	( ) neg ( ) pos	qPCR Linfonodo	___/___/___	( ) neg ( ) pos
RPA Sangue	___/___/___	( ) neg ( ) pos	RPA Linfonodo	___/___/___	( ) neg ( ) pos

#### 7 – OBSERVAÇÕES


**Anexo II.** Grupo 1: Animais positivos para pelo menos um dos testes listados de acordo com a presença de sinais clínicos e resultado dos testes realizados.

Cães	Escore Clínic		IR	Nº de parasitas/ 10 <sup>3</sup> células do hospedeiro	qPCR kDNA	RPA -LF
	o	DPP				
LPL-D001	1	Pos	0,06	Neg	Pos	Neg
LPL-D003	1	Pos	0,13	0,418	Neg	++
LPL-D005	1	Pos	0,80	1148,381	Pos	+++
LPL-D006	1	Pos	0,97	352,019	Pos	+++
LPL-D007	0	Neg	0,05	Neg	Pos	Neg
LPL-D008	0	Pos	1,04	2,812	Pos	+++
LPL-D009	1	Pos	0,20	Neg	Pos	Neg
LPL-D011	0	Neg	0,01	Neg	Neg	+++
LPL-D012	0	Pos	0,78	Neg	Pos	Neg
LPL-D014	0	Neg	0,00	ND	Neg	Neg
LPL-D016	0	Neg	0,01	ND	Neg	+
LPL-D017	1	Pos	0,17	Neg	Neg	+
LPL-D019	0	Pos	0,79	0,808	Pos	+++
LPL-D021	0	Pos	1,02	0,146	Pos	+++
LPL-D022	1	Pos	0,33	Neg	Pos	Neg
LPL-D023	0	Pos	0,28	0,883	Neg	+
LPL-D024	0	Neg	0,01	Neg	Neg	+
LPL-D026	1	Pos	0,96	132,880	Pos	+++
LPL-D027	0	Neg	0,01	Neg	Neg	+
LPL-D029	0	Neg	0,01	Neg	Neg	++
LPL-D030	0	Neg	0,00	Neg	Pos	Neg
LPL-D035	1	Pos	1,00	3,674	Pos	++
LPL-D038	0	Pos	0,08	Neg	Neg	Neg
LPL-D039	0	Neg	0,01	0,609	Neg	Neg
LPL-D040	0	Neg	0,00	3,665	Neg	+/-
LPL-D044	1	Neg	0,01	Neg	Pos	Neg
LPL-D045	0	Neg	0,02	Neg	Pos	Neg
LPL-D047	0	Neg	0,01	Neg	Neg	++
LPL-D048	0	Neg	0,01	Neg	Pos	Neg
LPL-D049	1	Pos	0,32	2,166	Pos	+
LPL-D052	0	Neg	0,00	Neg	Pos	+++
LPL-D053	0	Pos	0,44	86,330	Pos	Neg
LPL-D055	1	Neg	0,02	Neg	Pos	Neg
LPL-D056	0	Pos	0,10	Neg	Neg	Neg
LPL-D059	0	Neg	0,00	66,445	Neg	Neg
LPL-D060	0	Neg	0,00	4,322	Pos	+
LPL-D067	0	Pos	0,70	0,45	Pos	+++
LPL-D068	0	Pos	0,07	Neg	Pos	+++
LPL-D069	0	Pos	0,92	Neg	Neg	+++
LPL-D070	0	Pos	0,92	128,163	Pos	+++
LPL-D071	0	Neg	0,01	Neg	Neg	+
LPL-D073	0	Neg	0,01	ND	Neg	+++
LPL-D075	0	Neg	0,02	Neg	Neg	+

Continuação: Anexo II

Cães	Escore Clínic		IR	Nº de parasitas/ 10 <sup>3</sup> células do hospedeiro	qPCR kDNA	RPA -LF
	o	DPP				
LPL-D076	1	Pos	0,34	0,096	Pos	++
LPL-D077	0	Neg	0,01	ND	Neg	+++
LPL-D079	1	Pos	0,08	Neg	Neg	++
LPL-D080	0	Neg	0,01	Neg	Neg	++
LPL-D081	0	Neg	0,02	Neg	Neg	++
LPL-D082	0	Pos	0,20	Neg	Neg	Neg
LPL-D083	0	Neg	0,00	0,273	Pos	+++
LPL-D084	0	Pos	0,08	Neg	Neg	Neg
LPL-D085	0	Neg	0,00	Neg	Neg	+
LPL-D088	1	Neg	0,00	Neg	Neg	++
LPL-D089	0	Pos	0,12	Neg	Neg	Neg
LPL-D090	0	Neg	0,01	Neg	Neg	+
LPL-D091	0	Neg	0,00	Neg	Pos	++
LPL-D093	1	Pos	0,06	Neg	Pos	++
LPL-D095	0	Neg	0,01	Neg	Neg	+
LPL-D096	0	Neg	0,01	Neg	Neg	+++
LPL-D103	0	Neg	0,01	Neg	Pos	+
LPL-D105	1	Neg	0,01	Neg	Pos	+
LPL-D106	0	Pos	0,21	1165,031	Pos	+++
LPL-D107	1	Pos	0,62	246,228	Pos	+++
LPL-D108	0	Pos	0,07	Neg	Neg	Neg
LPL-D109	0	Pos	0,08	Neg	Neg	Neg
LPL-D113	0	Pos	0,12	0,975	Pos	+
LPL-D114	1	Pos	0,07	Neg	Neg	Neg
LPL-D115	1	Neg	0,01	0,260	Pos	++
LPL-D118	1	Pos	0,65	4,539	Pos	+
LPL-D119	0	Neg	0,00	0,201	Pos	++
LPL-D121	0	Pos	0,08	Neg	Neg	Neg
LPL-D122	1	Pos	0,10	11,045	Pos	++
LPL-D123	1	Pos	0,99	134,492	Pos	++
LPL-D124	1	Pos	0,06	Neg	Neg	Neg
LPL-D125	0	Neg	0,03	0,674	Pos	++
LPL-D130	0	Neg	0,01	2,994	Pos	+++
LPL-D131	0	Pos	0,98	10,112	Pos	++
LPL-D132	0	Pos	0,98	8,397	Pos	+
LPL-D139	0	Pos	0,07	Neg	Neg	Neg
LPL-D140	1	Neg	0,01	Neg	Neg	+
LPL-D143	0	Pos	0,42	0,827	Pos	++
LPL-D144	0	Pos	0,12	Neg	Neg	Neg
LPL-D147	0	Pos	0,81	707,860	Pos	+++
LPL-D148	0	Neg	0,01	Neg	Pos	++

Pos: Positivo; Neg: Negativo;SD: Sem dados.

+: Fracamente positivo; ++: Moderadamente positivo; +++: Fortemente positivo

**Anexo III.** Grupo 2: Distribuição dos 111 animais de acordo com escore clínico , resultado do DPP®LVC, Índice de Reatividade e carga parasitária esplênica.

<b>Animal</b>	<b>Escore Clínico</b>	<b>DPP®LVC</b>	<b>IR</b>	<b>Nº de parasitas/10<sup>6</sup> células do hospedeiro</b>
001/13B	7	Pos	0,76	1480000,00
001/14B	0	Pos	0,90	303,00
002/13B	6	Pos	3,63	542000,00
002/14B	6	Pos	1,50	3520,00
003/13B	1	Pos	0,61	4890,00
003/14B	2	Pos	1,88	46100,00
004/13B	6	Pos	2,11	1450000,00
004/14B	9	Pos	3,86	20300000,00
005/14B	2	Pos	1,20	71700,00
006/14B	5	Pos	3,53	134000,00
007/14B	3	Pos	2,97	60400,00
008/14B	3	Pos	1,83	6970000,00
009/14B	9	Pos	1,08	25600,00
010/14B	5	Pos	1,18	17100,00
011/14B	8	Pos	1,80	12100,00
012/14B	7	Pos	0,68	13500,00
013/14B	2	Pos	1,33	167000,00
014/14B	4	Neg	0,02	11600,00
015/14B	0	Pos	4,07	1440000,00
016/14B	6	Pos	0,89	25600,00
017/14B	7	Pos	1,99	4130000,00
018/14B	0	Pos	1,43	45700,00
019/14B	0	Pos	0,36	42900,00
020/14B	0	Neg	0,08	145,00
021/14B	0	Pos	2,99	91000,00
022/14B	8	Pos	1,42	60400,00
023/14B	1	Pos	0,99	78100,00
024/14B	3	Pos	0,43	1480000,00
025/14B	8	Pos	1,45	16200,00
026/14B	2	Pos	0,38	193,00
027/14B	8	Pos	0,18	134000,00
028/14B	5	Pos	0,67	165000,00
029/14B	9	Pos	1,80	1450000,00
031/14B	5	Pos	1,22	11600,00
032/14B	0	Pos	0,31	14600,00
033/14B	9	Pos	1,71	6970000,00
034/14B	9	Neg	0,16	15,80
035/14B	6	Pos	1,13	310,00
036/14B	12	Pos	0,59	1460,00
037/14B	10	Pos	0,90	2140,00
100	6	Pos	0,00	1460,00
101	0	Neg	0,08	16400,00
102	0	Neg	0,01	533,00
103	0	Neg	0,00	8170,00

**Continuação: Anexo III**

<b>Animal</b>	<b>Escore Clínico</b>	<b>DPP®LVC</b>	<b>IR</b>	<b>Nº de parasitas/10<sup>6</sup> células do hospedeiro</b>
105	9	Pos	1,64	165000,00
106	2	Pos	0,48	1900000,00
107	6	Pos	1,41	1770000,00
108	0	Pos	0,34	297000,00
109	2	Pos	0,33	656,00
110	4	Pos	0,98	8,00
111	8	Pos	3,69	8,00
113	8	Pos	0,40	26400,00
114	7,00	Pos	0,14	7700,00
115	5,00	Pos	0,08	56200,00
116	0,00	Pos	0,21	56200,00
219	0,00	Pos	0,29	6,30
220	6,00	Neg	0,00	15,80
221	5,00	Pos	0,86	3520,00
222	0,00	Neg	0,00	30,90
223	10,00	Pos	0,59	4,00
224	6,00	Pos	0,64	6970,00
226	6,00	Pos	0,17	7620000,00
227	5,00	Pos	0,80	1,00
228	1,00	Pos	0,37	10300,00
229	2,00	Neg	0,07	483000,00
230	7,00	Neg	0,03	42500,00
231	6,00	Pos	1,12	7840000,00
233	0,00	Pos	0,43	182000,00
234	6,00	Pos	0,16	12100,00
235	8,00	Pos	2,52	8070000,00
236	0,00	Pos	1,03	3770,00
237	3,00	Pos	1,32	42500,00
238	0,00	Pos	0,65	6110,00
239	15,00	Pos	0,68	1,00
240	5,00	Pos	1,70	7050000,00
241	10,00	Pos	1,06	7840000,00
242	6,00	Pos	0,89	4,00
243	8,00	Pos	0,84	2,00
244	3,00	Pos	0,38	1,00
245	5,00	Pos	1,80	4130000,00
246	2,00	Pos	0,23	1140000,00
247	2,00	Pos	0,72	1660000,00
248	7,00	Pos	0,82	16600000,00
249	3,00	Neg	0,03	7700,00
250	0,00	Neg	0,01	18400,00
251	0,00	Pos	0,10	5260000,00
252	3,00	Pos	0,67	2,00
253	11,00	Pos	0,27	7620000,00
254	8	Pos	0,82	1,00

**Continuação: Anexo III**

<b>Animal</b>	<b>Escore Clínico</b>	<b>DPP®LVC</b>	<b>IR</b>	<b>Nº de parasitas/10<sup>6</sup> células do hospedeiro</b>
255	12,00	Pos	1,24	31600000,00
256	7,00	Pos	0,68	7050000,00
257	6,00	Pos	0,93	8070000,00
258	5,00	Pos	2,22	16200,00
259	14,00	Pos	0,57	56200,00
260	4,00	Neg	0,07	2140,00
261	11,00	Pos	0,79	1770000,00
262	12,00	Pos	0,41	38600000,00
263	5,00	Neg	0,02	13500,00
265	9,00	Pos	0,54	542000,00
267	0,00	Neg	0,01	11600,00
268	0,00	Pos	0,85	2880,00
282	1,00	Pos	1,06	452000,00
283	7,00	Pos	1,19	17100,00
284	0	Neg	0,01	910,00
285	12,00	Pos	0,74	310,00
286	1,00	Neg	0,01	59,70
288	12,00	Pos	1,18	6970,00
290	3,00	Neg	0,02	26400,00
291	2,00	Pos	1,00	435000,00
292	0,00	Pos	1,00	28200,00
293	0,00	Neg	0,01	980,00

IR: Índice de Reatividade



Anexo IV. Resultados obtidos nos animais avaliados durante o período de acompanhamento.

Grupo	Cães	Primeira Visita (Janeiro)					Segunda Visita (Abril)						Terceira Visita (Agosto)					
		Score Clínico	DPP®LVC	IR	Parasitas/ 10 <sup>3</sup> Células de cão	RPA-LF	Score Clínico	DPP®LVC	IR	Parasitas/ 10 <sup>3</sup> Células de cão	RPA-LF	TI (%)	Score Clínico	DPP®LVC	IR	Parasitas/ 10 <sup>3</sup> Células de cão	RPA-LF	TI (%)
A	LPL-D067	0	Pos	0,70	0,45	Pos	Óbito	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
	LPL-D076	1	Pos	0,34	0,096	Pos	1	Pos	0,32	Neg	Pos	1,25	0	Pos	0,59	Neg	SD	NA*
	LPL-D107	1	Pos	0,62	246,228	Pos	Óbito	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
	LPL-D113	0	Pos	0,12	0,975	Pos	2	Pos	0,48	17,131	Pos	5,00	Óbito	SD	SD	SD	SD	SD
	LPL-D118	1	Pos	0,65	4,539	Pos	1	Pos	0,26	3,625	Pos	0	Óbito	SD	SD	SD	SD	SD
	LPL-D122	1	Pos	0,10	11,045	Pos	Óbito	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
	LPL-D123	1	Pos	0,99	134,492	Pos	Óbito	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
	LPL-D132	0	Pos	0,98	8,397	Pos	1	Pos	0,89	3,199	Pos	10,00	Óbito	SD	SD	SD	SD	SD
	LPL-D143	0	Pos	0,42	0,827	Pos	0	Pos	0,60	1,684	Pos	2,00	0	Pos	0,69	1,326	Pos	10,00*
B	LPL-D082	0	Pos	0,20	Neg	Neg	0	Neg	0,03	Neg	Neg	4,29	0	Pos	0,58	0,291	Neg	0,00
	LPL-D084	0	Pos	0,08	Neg	Neg	0	Pos	0,08	Neg	Pos	0,00	0	Pos	0,08	Neg	Neg	2,00**
	LPL-D089	0	Pos	0,12	Neg	Neg	0	Pos	0,11	Neg	Pos	2,50	0	Pos	0,30	Neg	Pos	8,00**
	LPL-D109	0	Pos	0,08	Neg	Neg	0	Pos	0,09	Neg	Pos	0,00	0	Pos	0,07	2,100	Neg	2,50
	LPL-D114	1	Pos	0,07	Neg	Neg	0	Pos	0,20	Neg	Pos	0,00	0	Pos	0,56	Neg	Neg	0,00
	LPL-D121	0	Pos	0,08	Neg	Neg	1	Neg	0,03	Neg	Neg	4,00	Óbito	SD	SD	SD	SD	SD
	LPL-D124	1	Pos	0,06	Neg	Neg	3	Pos	0,13	Neg	Neg	0,00	1	Pos	0,95	Neg	Neg	0,00
	LPL-D139	0	Pos	0,07	Neg	Neg	0	Pos	0,10	Neg	Pos	2,50	0	Pos	0,16	5,523	Neg	0,00

Continuação: Anexo IV

Grupo	Cães	Primeira Visita (Janeiro)					Segunda Visita (Abril)						Terceira Visita (Agosto)					
		Score Clínico	DPP®LVC	IR	Parasitas/ 10 <sup>3</sup> Células de cão	RPA-LF	Score Clínico	DPP®LVC	IR	Parasitas/ 10 <sup>3</sup> Células de cão	RPA-LF	TI(%)	Score Clínico	DPP®LVC	IR	Parasitas/ 10 <sup>3</sup> Células de cão	RPA-LF	TI(%)
C	LPL-D068	0	Pos	0,07	Neg	0	0	Pos	0,09	Neg	Neg	2,22	0	Pos	0,43	1,798	Neg	0,00*
	LPL-D093	1	Pos	0,06	Neg	Pos	0	Pos	0,10	Neg	Neg	2,00	0	Pos	0,07	2,667	Pos	6,00
	LPL-D069	0	Pos	0,92	Neg	Pos	0	Pos	0,84	2,396	Pos	0,00	0	Pos	0,88	Neg	Pos	0,00*
	LPL-D083	0	Neg	0,00	0,273	Pos	0	Pos	0,08	0,894	Pos	6,67	0	Neg	0,01	0,560	Pos	6,67**
	LPL-D115	1	Neg	0,01	0,260	Pos	1	Neg	0,02	Neg	Pos	5,00	2	Neg	0,01	Neg	Pos	0,00
	LPL-D119	0	Neg	0,00	0,201	Pos	0	Neg	0,00	Neg	Pos	0,00	0	Neg	0,04	0,424	Neg	2,00*
	LPL-D125	0	Neg	0,03	0,674	Pos	0	Neg	0,00	Neg	Pos	1,43	0	Pos	0,14	Neg	Neg	0,00
	LPL-D130	0	Neg	0,01	2,994	Pos	1	Neg	0,01	2,771	Pos	4,00	Óbito	SD	SD	SD	SD	SD
	LPL-D091	0	Neg	0,00	Neg	Pos	1	Neg	0,01	Neg	Pos	5,00	0	Neg	0,01	Neg	Pos	5,00
	LPL-D103	0	Neg	0,01	Neg	Pos	0	Neg	0,00	Neg	Pos	2,00	1	Neg	0,01	Neg	Neg	0,00
	LPL-D105	1	Neg	0,01	Neg	Pos	0	Neg	0,00	Neg	Neg	0,00	Óbito	SD	SD	SD	SD	SD
	LPL-D071	0	Neg	0,01	Neg	Pos	0	Neg	0,00	Neg	Neg	0,00	0	Neg	0,00	Neg	Neg	0,00
	LPL-D075	0	Neg	0,02	Neg	Pos	0	Neg	0,00	Neg	Neg	0,00	0	Neg	0,02	Neg	Neg	0,00*
	LPL-D081	0	Neg	0,02	Neg	Pos	1	Pos	0,18	Neg	Neg	8,33	4	Pos	0,85	0,222	Pos	4,00
	LPL-D085	0	Neg	0,00	Neg	Pos	0	Neg	0,02	Neg	Neg	0,00	0	Neg	0,01	Neg	Neg	0,00
	LPL-D090	0	Neg	0,01	Neg	Pos	0	Neg	0,01	Neg	Pos	3,33	0	Neg	0,00	Neg	Neg	3,33**
	LPL-D095	0	Neg	0,01	Neg	Pos	0	Neg	0,01	Neg	Pos	4,29	Óbito	SD	SD	SD	SD	SD
	LPL-D096	0	Neg	0,01	Neg	Pos	1	Neg	0,00	Neg	Neg	0,00	Óbito	SD	SD	SD	SD	SD
	LPL-D140	1	Neg	0,01	Neg	Pos	1	Neg	0,01	Neg	Pos	5,00	0	Neg	0,00	Neg	Pos	NA*

Continuação: Anexo IV

Grupo	Cães	Primeira Visita (Janeiro)					Segunda Visita (Abril)						Terceira Visita (Agosto)					
		Score Clínico	DPP®LVC	IR	Parasitas/ 10 <sup>3</sup> Células de cão	RPA-LF	Score Clínico	DPP®LVC	IR	Parasitas/ 10 <sup>3</sup> Células de cão	RPA-LF	TI (%)	Score Clínico	DPP®LVC	IR	Parasitas/ 10 <sup>3</sup> Células de cão	RPA-LF	TI (%)
D	LPL-D110	0	Neg	0,00	Neg	Neg	1	Neg	0,01	0,462	Pos	0,00	0	Neg	0,02	1,745	Neg	2,00
	LPL-D116	0	Neg	0,01	Neg	Neg	1	Neg	0,01	Neg	Pos	0,00	Óbito	SD	SD	SD	SD	SD
	LPL-D117	0	Neg	0,03	Neg	Neg	0	Pos	0,20	Neg	Neg	1,43	0	Pos	0,17	0,068	Neg	0,00
	LPL-D120	0	Neg	0,00	Neg	Neg	0	Neg	0,00	Neg	Pos	2,50	0	Pos	0,15	Neg	Neg	7,50
	LPL-D134	0	Neg	0,00	Neg	Neg	1	Neg	0,00	Neg	Pos	0,00	Óbito	SD	SD	SD	SD	SD
	LPL-D136	1	Neg	0,00	Neg	Neg	1	Neg	0,01	Neg	Pos	0,00	0	Neg	0,02	Neg	Pos	0,00
	LPL-D137	1	Neg	0,01	Neg	Neg	1	Neg	0,00	Neg	Pos	1,25	Óbito	SD	SD	SD	SD	SD
	LPL-D138	0	Neg	0,00	Neg	Neg	1	Neg	0,02	Neg	Neg	3,33	Óbito	SD	SD	SD	SD	SD

\*Animais que ainda estavam com a coleira na terceira visita ; \*\*Animais que retiraram a coleira uma semana antes do xenodiagnóstico; SD: sem dados; NA: não autorizado

