

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO

**DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: USO DE
PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS DE *Leishmania infantum***

NATHÁLIA LOPES FONTOURA MATEUS

CAMPO GRANDE, MS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO

**DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: USO DE
PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS DE *Leishmania infantum***

Antigenic proteins of *Leishmania infantum* for the diagnostic of canine visceral
leishmaniasis

NATHÁLIA LOPES FONTOURA MATEUS

Orientadora: Prof. Dr^a. Eliane Mattos Piranda

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias como
requisito à obtenção do título de
Mestre em Ciências
Veterinárias.

CAMPO GRANDE, MS

2018



Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG/PROPP)



Ata de Defesa de Dissertação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Mestrado

Aos vinte e seis dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezoito, às treze horas e trinta minutos, na sala B da pós-graduação, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Eliane Mattos Piranda (UFMS), Fernando de Almeida Borges (UFMS) e Ines Aparecida Tozetti (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **NATHÁLIA LOPES FONTOURA MATEUS**, CPF 02286627100, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: USO DE PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS DE Leishmania infantum**" e orientação de Eliane Mattos Piranda. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu Parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

Dra. Eliane Mattos Piranda

Dr. Fernando de Almeida Borges

Dra. Ines Aparecida Tozetti

Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira (Suplente)

ASSINATURA

[Assinatura de Eliane Mattos Piranda]
[Assinatura de Fernando de Almeida Borges]
[Assinatura de Ines Aparecida Tozetti]

AValiação

APROVADA
APROVADA
APROVADA

RESULTADO FINAL:

☒ Aprovação

☐ Aprovação com revisão

☐ Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Sem observações.

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

[Assinatura de Eliane Mattos Piranda]
Presidente da Banca Examinadora

[Assinatura de Nathalia Lopes Fontoura Mateus]
Aluna

**“A todos os cães, tutores e médicos veterinários que sofrem ou já
sofreram com a angústia da
leishmaniose visceral canina”**

AGRADECIMENTOS

Este trabalho jamais seria possível sem a ajuda dos membros do Laboratório de Parasitologia Humana. Agradeço imensamente por fazer parte desta equipe e sempre digo que com vocês ao lado, qualquer objetivo é possível. Vocês foram de extrema importância não só para o meu crescimento profissional, mas principalmente pessoal. Dentro desta família tenho muitos exemplos de pessoas fortes, batalhadoras, inteligentíssimas, éticas, competentes e extremamente agradáveis e engraçadas de conviver. Sempre que passo por alguma situação difícil, procuro um exemplo dentro da parasito e me vem a imagem de um de vocês, ou as vezes até ouço seus dizeres em minha mente. Confesso que se para muitos o mestrado é uma fase difícil, para mim se tornou uma experiência muito prazerosa e construtiva com a contribuição de cada um da nossa amada família parasito.

Agradeço a Deus por me presentear com oportunidades e pessoas tão maravilhosas na minha vida.

Aos meus pais, Marina e Juarez, por nunca medirem esforços, carinho e palavras de incentivo para ver meus sonhos concretizados. Em especial à minha mãe, você sempre será minha ídola, exemplo de pessoa dedicada, exigente e de coração tão bom.

À minha orientadora, Professora Dra. Eliane Piranda, por ser exemplo de profissional e educadora, por inspirar em mim a vontade de ser professora, pela confiança e amizade construída. Se alguns tiveram medo de seu orientador, eu só tenho admiração e gratidão pela minha (e ciúmes também). Obrigada Prof. por acreditar em mim e ter tanta paciência e compreensão com a minha ansiedade e jeitinho acelerado. Sou grata por todos os conselhos e por ter tido a oportunidade de aprender tanto com você, não só na área da pesquisa, mas também como médica veterinária e como pessoa.

À professora Dra. Maria Socorro Cruz pela confiança e oportunidade de participar nesta pesquisa de importância nacional. Obrigada pelas contribuições e ensinamentos transmitidos durante esta jornada.

Ao Leandro Borges, pela oportunidade de participar em seu projeto, conhecer o serviço da vigilância, pelo companheirismo e dedicação e por sua mãe tão atenciosa que me recebeu muito bem em Camapuã durante o período de coleta.

À minha amiga irmã Marcela, por ser fonte de companheirismo e força em todas as situações que enfrentamos. Obrigada pela sua amizade sincera e por tornar mesmo os momentos de desespero divertidos. Você é exemplo de amiga batalhadora, indestrutível e dedicada.

À professora Dra. Alessandra Gutierrez pela confiança e por me receber tão bem no laboratório de parasitologia humana. Agradeço imensamente pelos ensinamentos, pela inspiração em ser professora e por tantas oportunidades que você me proporcionou na área da pesquisa. Sou muito grata por fazer parte da sua equipe e por ter sua amizade.

À Elisa Oshiro Teruya por sua amizade, carinho e lanchinhos diários no laboratório. Você é a pessoa mais inteligente e sábia que conheço e sou muito grata por poder desfrutar durante todo esse tempo dos seus conselhos, ensinamentos e companhia.

À Aline Casaril, Suellem Barrios, Wagner Fernandes, Vanessa Chociai e Jucelei Infran por tornarem todos os dias do mestrado mais alegres. Sempre que as situações se tornavam difíceis, me lembrava que na sala ao lado haviam pessoas que eram exemplo de superação e sempre

acreditaram em mim e não seria justo despontá-las. Obrigada por todo o carinho, conselhos, abraços, chororô e risadas. Vocês foram fundamentais para que essa etapa fosse de sucesso e inesquecível.

Aos meus amigos, familiares e meu namorado pela compreensão, carinho e incentivo durante esta etapa difícil e atarefada.

À Professora Dra. Alda Teixeira por sua solicitude comigo, sempre disposta a me ajudar a solucionar algum problema da biomol. Obrigada por sua atenção, empenho e pelos ensinamentos durante esse período.

Aos professores Dr. Carlos Fernandes e Everton Oliveira pela ajuda com análise estatística, sempre dispostos a me atender e sanar muitas dúvidas. Muito obrigada pela paciência, dedicação e solicitude durante este trabalho.

Ao professor Dr. Marcos Rogério André pelo fornecimento dos controles positivos para as reações em cadeia da polimerase.

Ao professor Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos pelo fornecimento dos controles positivos para as reações em cadeia da polimerase e pela disponibilização de seu laboratório e equipamentos.

Ao professor Dr. Manuel Soto pelo fornecimento das placas de ELISA sensibilizadas e pela atenção e os ensinamentos transmitidos durante o curso de ELISA.

À Laura Ramirez, Leopoldo Nascimento e Luana Moura pela recepção e solicitude durante o curso no Piauí, sempre dispostos a nos ensinar e nos fazer sentir em casa.

Aos meus alunos de iniciação científica, Karina Franco, Paulo Monteiro e Lucas Taketa. Sou extremamente grata à ajuda de vocês neste trabalho, vocês foram meu braço direito e fundamentais para que no final tudo desse certo. Obrigada pela dedicação e pelo companheirismo.

À Aline Casaril e Mirella Santos por terem sido minhas mentoras durante o período de iniciação científica e terem me inspirado a seguir seus caminhos. Obrigada pela paciência, dedicação e pela oportunidade de aprender e conviver com duas pessoas tão incríveis. Admiro muito a competência e a personalidade de vocês. Obrigada Aline por toda ajuda e ensinamentos na biomol, serei eternamente grata por ter aprendido com você e seu dom de ensinar tão facilmente é uma das razões que me fez gostar tanto desta área.

À Lana, Camila e Rose do Laboratório de Biologia Molecular/Inbio/UFMS pela ajuda e disponibilidade durante a leitura dos ELISAs.

À Jéssica Teles e Herbert Cleveland pelo auxílio e disponibilidade no Laboratório de Biologia Molecular/FAMEZ/UFMS.

Aos residentes do Hospital Veterinário da UFMS pela ajuda e respeito durante as coletas das amostras.

Aos cães e seus tutores por consentirem em participar deste projeto e pela compreensão, atenção, carinho e respeito.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram ou torceram por este trabalho.

RESUMO

Os cães desempenham importante papel na cadeia epidemiológica da leishmaniose visceral (LV), sendo considerados o principal reservatório urbano do parasita *Leishmania infantum* no Brasil. O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) também representa um dos maiores entraves para o controle da LV. A variedade de manifestações clínicas apresentadas e a ausência de um diagnóstico 100% sensível e específico, fazem com que resultados falso-positivos e falso-negativos ainda sejam observados nos exames sorológicos disponíveis. É sabido que a expressividade dos sinais clínicos se altera durante o curso da LVC e está correlacionada à positividade nos exames diagnósticos para a enfermidade. Além disso, fatores como o antígeno utilizado no teste sorológico e a prevalência da transmissão de *L. infantum* na região estudada interferem na sensibilidade e especificidade do exame sorológico, gerando desafios adicionais ao diagnóstico da LVC. Atualmente, o Ministério da Saúde utiliza o teste rápido imunocromatográfico TR-DPP®, composto por uma fusão de antígenos recombinantes, como método de triagem dos animais suspeitos e a reação de imunoadsorção enzimática (ELISA), desenvolvida a partir de antígeno bruto do parasita, como técnica confirmatória. A utilização de antígenos brutos solúveis do parasita no ELISA apresenta alta sensibilidade e baixa especificidade devido à ocorrência de reação cruzada com outros agentes patogênicos. Apesar da identificação de diversas proteínas antigênicas com potencial para o diagnóstico da enfermidade, pouco se sabe sobre o desempenho destas em populações de cães com perfis clínicos diferenciados e provenientes de áreas epidemiologicamente distintas. Neste contexto esta dissertação contempla dois artigos: o primeiro trabalho visou averiguar o potencial diagnóstico do antígeno solúvel total de *L. infantum* (SLA) e de proteínas antigênicas recombinantes de *L. infantum* (KMP-11, LiP2a, LiP2b, LiP0, H2A, HSP70, HSP83) no teste ELISA, em amostras de cães com perfis clínicos distintos (animais sintomáticos e assintomáticos para LVC, negativos para LVC, negativos para LVC e infectados com outros hemoparasitas e vacinados contra LVC), provenientes de áreas de transmissão intensa (Campo Grande/MS) e esporádica (Camapuã/MS) para LV. No segundo artigo foram avaliadas as manifestações clínicas e a resposta ao TR-DPP® em cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. nestes municípios. Sugere-se a investigação dos antígenos HSP70 e LiP2a, utilizados de forma combinada no ELISA, com o intuito de obter um teste confirmatório de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade superior ao teste atualmente utilizado e conclui-se que a utilização do TR-DPP® como ferramenta de triagem e do sistema de pontuação clínica deve ser empregada com cautela em regiões de transmissão esporádica de LV.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, ELISA, Sorologia.

ABSTRACT

Dogs play an important role in the epidemiological chain of visceral leishmaniasis (VL), being considered the main urban reservoir of the parasite *Leishmania infantum* in Brazil. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) is also one of the major obstacles to VL control. The variety of clinical manifestations presented, and the absence of an 100% sensitive and specific diagnosis make false-positive and false-negative results still observed in the available serological tests. It is known that the expressiveness of clinical signs changes during the course of CVL and it is correlated to the positivity in the diagnostic exams. In addition, factors such as the antigen used in the serological test and the prevalence of *L. infantum* transmission in the studied region interfere with the sensitivity and specificity of the serological test, which generates additional challenges to the diagnosis of CVL. Currently, the Ministry of Health uses the rapid immunochromatographic test TR-DPP®, consisting of a fusion of recombinant antigens, as a screening method to detect suspect animals. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), developed from the parasite's crude antigen is used as the confirmatory technique. The use of soluble antigens of the parasite in the ELISA has high sensitivity and low specificity due to the occurrence of cross-reactions with other pathogens. Despite the identification of several antigenic proteins with potential for the diagnosis of CVL, a few is known about their performance in dog's populations with differentiated clinical profiles, coming from epidemiologically distinct areas. In this context, this dissertation contains two articles: the first one aimed to investigate the diagnostic potential of *L. infantum* total soluble antigen (SLA) and recombinant antigens of *L. infantum* (KMP-11, LiP2a, LiP2b, LiP0, H2A, HSP70, HSP83) in samples from dogs with distinct clinical profiles (symptomatic and asymptomatic animals for CVL, negative for CVL, negative for CVL and infected with other hemoparasites and, vaccinated against CVL) from areas of intense (Campo Grande/MS) and sporadic (Camapuã/MS) transmission for VL. The second article evaluated the clinical manifestations and the response to TR-DPP® in dogs naturally infected with *Leishmania* sp. in these municipalities. We suggest the investigation of the HSP70 and LiP2a antigens, used in a combined manner in the ELISA, in order to obtain a confirmatory test of superior sensitivity, specificity and reproducibility, compared to the currently used test. It is concluded that the use of TR-DPP® as screening tool and the use of clinical scoring system should be performed cautiously in regions of sporadic transmission of VL.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis, ELISA, Serology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 Leishmaniose Visceral Canina (LVC)	13
3.1.1 Diagnóstico	14
3.1.1.1 Diagnóstico Parasitológico Direto	14
3.1.1.2 Diagnóstico Parasitológico Molecular	15
3.1.1.3 Diagnóstico Sorológico	15
3.2 Vetores	17
3.3 Epidemiologia	18
3.3.1 Leishmaniose visceral americana em Campo Grande	18
3.3.2 Leishmaniose visceral americana em Camapuã	18
4. REFERÊNCIAS	19
5. ARTIGO 1.....	28
Abstract	29
Resumo	29
Introdução	30
Material e Métodos	33
Resultados e discussão	39
Conclusão	48
Agradecimentos	48
Referências	53
6. ARTIGO 2.....	62
Abstract	63
Resumo	63
Introdução	64
Material e métodos	66
Resultados	72
Discussão	78

Conclusão	83
Agradecimentos	83
Referências	83
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
8. ANEXOS	90
Anexo I: Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA/ UFMS para as amostras provenientes de animais de Camapuã/MS.	90
Anexo II: Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA/ UFMS para as amostras provenientes de animais de Campo Grande/MS.	91
Anexo III: Termo de consentimento livre esclarecido para as amostras provenientes de animais de Camapuã/MS.	92
Anexo IV: Termo de consentimento livre esclarecido para as amostras provenientes de animais de Campo Grande/MS.	93
Anexo V: Ficha de avaliação clínica adaptada de Silva et al. (2017).	95
Anexo VI: Normas da Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária	96

LISTA DE ABREVIATURAS

ASC	Área sob a curva
AUC	<i>Area under the curve</i>
BB	Tampão de bloqueio
CG	Campo Grande
C	Camapuã
CVL	<i>Canine visceral leishmaniasis</i>
DAILYs	<i>Disability-adjusted life years</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Reação de imunoadsorção enzimática
H2A	Proteína nucleossomal H2A
HSP70	Proteína de choque térmico 70
HSP83	Proteína de choque térmico 83
KMP-11	Proteína de membrana dos cinetoplastídeos de 11KDa
LiP2a	Proteína ribossomal ácida P2a
LiP2b	Proteína ribossomal ácida P2b
LiP0	Proteína ribossomal ácida P0
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
LVC	Leishmaniose visceral canina
nPCR	<i>nested PCR</i>
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS-TB	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCB	Tampão citrato-fosfato com perborato de sódio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	<i>PCR Restriction fragment length</i>
ROC	<i>Receiver operator characteristic</i>
SLA	Antígeno solúvel total de <i>Leishmania</i>
TBE	Tris-Borato de EDTA
TR-DPP®	Teste rápido imunocromatográfico <i>Dual Path Platform®</i>
VL	<i>Visceral leishmaniasis</i>
χ^2	Qui-quadrado

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral americana (LVA) é uma antroponose reemergente causada pelo protozoário flagelado *Leishmania infantum*, o qual no momento do repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas (Psychodidae: Phlebotominae) é transmitido aos hospedeiros vertebrados (GRIMALDI; TESH, 1993; ASHFORD, 2000; DESJEUX, 2004).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a LVA é a terceira doença infecciosa de prioridade no mundo, visto elevado indicador econômico DALYs (“*Disability-adjusted life years*”) que infere os anos de vida produtiva perdidos por incapacidade ou morte prematura (WHO/TDR/2007). Endêmica em 98 países, no Brasil é de notificação compulsória sendo registrada nas cinco regiões (ALVAR et al., 2012; PEIXOTO et al., 2015).

O estado de Mato Grosso do Sul (MS) notificou 1.521 casos humanos confirmados de 2010 a 18 de julho de 2017. Apenas neste último ano, foram 63 casos novos até 18 de julho, distribuídos em 13 municípios do estado. Além da elevada incidência, a taxa de letalidade permanece alta (7,2%) demonstrando a gravidade da doença e as condições de assistência e vigilância em Mato Grosso do Sul (MATO GROSSO DO SUL, 2017).

Alguns fatores foram determinantes para a expansão da doença para grandes centros urbanos e regiões periurbanas, dentre eles: proximidade do cão ao homem, processo migratório constante, ocupação desordenada e adaptação de espécies vetorais a diferentes nichos (DANTAS-TORRES et al., 2006).

Os cães são importantes reservatórios de *L. infantum* devido à alta carga parasitária apresentada na pele mesmo quando estes animais estão assintomáticos, facilitando a infecção do vetor pelo parasita (DEANE; DEANE, 1955; MOLINA et al., 1994; TRAVI et al., 2001; DA COSTA-VAL et al., 2007; VERÇOSA et al., 2008; SOARES et al., 2011; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016). Ademais, a enzootia canina usualmente precede os casos humanos, refletindo a importância do monitoramento da infecção canina como um possível marcador de transmissão e (re)emergência de LVA (PARANHOS-SILVA et al., 1996; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016).

O diagnóstico preciso da leishmaniose visceral canina (LVC) é um dos maiores entraves para o controle desta zoonose. A inespecificidade dos sinais clínicos e a maneira pleomórfica como se apresentam faz o diagnóstico clínico insuficiente, sendo necessária uma associação de métodos laboratoriais, tais como exames parasitológicos, sorológicos e/ou moleculares, para sua conclusão (PALATINIK-SOUZA et al., 2001; GONTIJO; MELO, 2004; MOREIRA et al., 2007).

No Brasil, as medidas profiláticas da LVA preconizadas pelo Ministério da Saúde são: diagnóstico precoce e tratamento dos humanos; controle do vetor e eliminação dos cães soropositivos. As amostras dos animais são submetidas à triagem por meio do teste rápido imunocromatográfico (TR-DPP® Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brasil), e se positivas são analisadas pela reação de imunoadsorção enzimática (ELISA) (BRASIL, 2011; 2014). No entanto, não existe uma técnica com 100% de sensibilidade e especificidade, assim resultados falso-positivos e falso-negativos são observados (GONTIJO; MELO, 2004).

Desta forma, é necessário buscar métodos diagnósticos para LVC de maior acurácia; que permitam identificar precocemente a infecção em cães assintomáticos, assim como diferenciar cães vacinados e acometidos por outras enfermidades. Estes fatores são essenciais para evitar a manutenção de animais infectados no ambiente, a dispersão da doença e reduzir as eutanásias (FERREIRA et al., 2008; LAURENTI et al., 2014; NUNES et al., 2015; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016).

Nos últimos anos, os avanços tecnológicos permitiram a identificação de diversas proteínas antigênicas de *L. infantum*. No entanto, poucas foram colocadas em prática para avaliação. Esta etapa depende de plataformas sensíveis e estudos clínicos colaborativos, que permitam o recrutamento e a caracterização dos indivíduos e suas amostras de acordo com parâmetros

definidos (BARBOSA et al., 2012). A presente proposta permitiu avaliar o uso de proteínas recombinantes no diagnóstico de LVC buscando aumentar a sensibilidade do ELISA utilizado como teste confirmatório para esta zoonose.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Testar o uso de diferentes proteínas antigênicas recombinantes de *L. infantum* no ensaio imunoenzimático (ELISA) para o diagnóstico de LVC em duas regiões de Mato Grosso do Sul.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Avaliar o potencial diagnóstico da proteína de membrana dos cinetoplastídeos KMP-11, das proteínas ácidas ribossomais LiP2a, LiP2b e LiP0, da histona H2A, das proteínas de choque térmico HSP70 e HSP83 e do antígeno solúvel total de *L. infantum* (SLA) para leishmaniose visceral canina.
- 2.2.2 Verificar a eficiência do teste rápido imunocromatográfico TR-DPP® no diagnóstico de cães com *Leishmania* spp.´
- 2.2.3 Associar manifestações clínicas de cães com suspeita de leishmaniose visceral canina aos resultados do teste rápido imunocromatográfico TR-DPP®.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

A LVC é uma zoonose causada, no Brasil, pelo protozoário flagelado heteroxeno *Leishmania infantum*, o qual é transmitido a mamíferos, incluindo cães e humanos, durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas (Psychodidae: Phlebotominae) (DESJEUX, 2004; GRIMALDI; TESH, 1993).

A enzootia canina, que usualmente precede a ocorrência de casos humanos, aliada a maior prevalência de casos caninos quando comparados aos casos humanos são fatores que ressaltam a importância do cão no ciclo da LVA (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

Este tema vem sendo discutido desde 1908, quando experimentalmente comprovou-se a infecção do cão (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; ASHFORD et al., 2000). Décadas após, o papel do cão como reservatório da leishmaniose visceral (LV) foi estabelecido (DEANE; DEANE, 1955) e este foi incriminado como o mais importante reservatório de *L. infantum* no ciclo rural e principalmente nas áreas urbanas. Os canídeos selvagens, embora incriminados por Deane e Deane (1955), não mantem contato estreito com o peridomicílio e são importantes apenas na manutenção do ciclo de LV no ecótopo silvestre (ASHFORD, 1996; CABRERA, 1999).

Por se tratar de uma doença de acometimento sistêmico e de complexa patofisiologia, a LVC apresenta manifestações clínicas bastante variáveis de acordo com a parasitemia, local de inoculação do parasita, competência imunológica do cão e estágio da doença; fatores que dificultam a realização do diagnóstico clínico (PINELLI et al., 1994; QUINNELL et al., 2001; MORENO; ALVAR, 2002). Dentre os principais sinais clínicos observados na LVC estão: linfadenomegalia, perda de peso, alterações dermatológicas, onicogrifose, hepatomegalia, esplenomegalia, glomerulopatias, claudicação, epistaxe e lesões oculares (MOREIRA et al., 2007; MAIA; CAMPINO, 2008).

Mancianti et al. (1988) classificaram os cães infectados em assintomáticos, quando não há evidências de sinais clínicos; oligossintomáticos, quando apresentam de um a três sinais

clínicos; e sintomáticos quando mais de três sinais clínicos podem ser observados no animal. Já Solano-Gallego et al. (2009) classificaram os animais com LVC em apenas dois grupos, saudáveis infectados com *Leishmania* spp. e doentes, quando estes últimos apresentarem qualquer alteração no exame físico ou mesmo alterações laboratoriais, como no hemograma, exames bioquímicos ou urinálise. Em prosseguimento a esta classificação, estes autores também desenvolveram um protocolo de estadiamento da LVC, baseado nas alterações clínicas e laboratoriais, incluindo resultados sorológicos. Por outro lado, Silva et al. (2017) utilizaram um conjunto de 14 sinais clínicos para compor um escore de avaliação dos animais infectados por LVC, no qual animais com pontuação até três são classificados como assintomáticos e superior a três, são classificados como sintomáticos.

O intenso parasitismo cutâneo no cão reforça a importância deste animal doméstico no ciclo da LVA, tendo em vista que esse órgão é comumente um dos mais afetados (FERRER et al., 1999; QUEIROZ et al., 2010; SILVA et al., 2017). A intensidade dos sinais clínicos no hospedeiro canino está correlacionada à sua eficácia como reservatório, aumentando a probabilidade de ocorrer a infecção do vetor pelo parasito a partir do cão infectado (SOARES et al., 2011); no entanto, cães assintomáticos são de grande importância epidemiológica visto que também apresentam formas amastigotas na pele, as quais podem infectar o vetor, durante o repasto sanguíneo do inseto nestes animais. Além disso, por vezes os cães assintomáticos não são detectados em testes sorológicos (LAURENTI et al., 2013), uma vez que a expressividade dos sinais clínicos está correlacionada à positividade nos exames diagnósticos para LVC (SILVA et al., 2017).

3.1.1 Diagnóstico

O correto diagnóstico da LVC tem sido um problema para o controle desta zoonose, visto que apesar da variedade e do avanço nos testes disponíveis para o diagnóstico, não há ainda nenhum método que apresente 100% de especificidade e de sensibilidade (GONTIJO; MELO, 2004).

A variedade de manifestações clínicas apresentadas pelos animais infectados aliada à compatibilidade destes sinais clínicos com outras enfermidades torna o diagnóstico clínico da LVC inviável e faz necessária a associação de outros métodos, como exames parasitológicos, sorológicos, moleculares, análise epidemiológica e diagnósticos diferenciais para que se possa inferir um diagnóstico definitivo (PALATINIK-SOUZA et al., 2001; GONTIJO; MELO, 2004).

3.1.1.1 Diagnóstico Parasitológico Direto

O diagnóstico parasitológico direto apresenta 100% de especificidade e é realizado observando-se formas amastigotas do parasita *Leishmania* spp. em algum tecido do animal (GONTIJO; MELO, 2004; SANTOS et al., 2014). É considerado um diagnóstico definitivo e padrão ouro, pois diante da positividade não há dúvidas; porém apresenta baixa sensibilidade devido à distribuição dos parasitas nos tecidos não ser homogênea mesmo em cães sintomáticos e por diferir conforme a evolução da doença no animal; além de requisitar elevada experiência do profissional responsável e demandar tempo para sua execução (GUERIN et al., 2002; GONTIJO; MELO, 2004; MOREIRA et al., 2007; CARREGAL, 2011; SANTOS et al., 2014).

O material para análise pode ser obtido por meio de biópsia ou punção aspirativa de baço, fígado, medula óssea ou linfonodos, ou ainda de lesões cutâneas; o qual pode ser analisado sob a forma de esfregaço, impressão em lâminas, isolamento em meios de cultura, inoculação em animais de laboratório ou técnicas histopatológicas (GONTIJO; MELO, 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Amostras de linfonodo apresentam sensibilidade entre 40 e 50% para o diagnóstico parasitológico direto (ALVAR et al., 2004), sendo esta técnica utilizada na rotina de clínicas veterinárias para confirmação do diagnóstico. O aspirado de medula óssea apresenta sensibilidade de 60 a 75% (ALVAR et al., 2004) e Barrouin-Melo et al. (2004) sugeriram o uso de

material aspirado de baço ao invés de linfonodo para este tipo de diagnóstico já que o mesmo apresenta maior sensibilidade (98%). Entretanto, a punção de baço, assim como de medula óssea, são técnicas consideradas invasivas e dificilmente aplicáveis em estudos epidemiológicos ou mesmo em diagnósticos individuais em animais vivos (GONTIJO; MELO, 2004).

3.1.1.2 Diagnóstico Parasitológico Molecular

A partir da década de 1980, diferentes métodos moleculares foram desenvolvidos para a detecção de material genético de protozoários do gênero *Leishmania*, dentre eles a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). Essa técnica trouxe a inovação de detectar quantidades mínimas de DNA independentemente da imunocompetência, estágio da doença ou manifestação clínica apresentada pelo animal, com a vantagem de ser aplicável em diferentes tipos de amostras, tais como aspirados de medula óssea e linfonodos, biópsias de pele, amostras de sangue periférico e *swab* de mucosa oral ou ocular (WEISS, 1995; GONTIJO; MELO, 2004; GOMES et al., 2008; LOMBARDO et al., 2012). Além disso, as variações das técnicas de PCR trouxeram a possibilidade de monitorar o tratamento dos pacientes através da carga parasitária monitorada pela PCR quantitativa (*real time* PCR) e ainda, permitiram identificar a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção através da PCR *restriction length fragment* (PCR-RFLP) (GONTIJO; MELO, 2004; LOPES, 2010).

Queiroz et al. (2010) demonstraram a eficiência da técnica de PCR em detectar animais assintomáticos, mesmo antes da soroconversão destes, e sugerem que esta deveria ser a técnica de eleição para o diagnóstico da enfermidade canina. Entretanto, os métodos moleculares são de elevado custo e requerem bastante tempo para execução, inviabilizando seu uso em larga escala na rotina clínica, além da ausência de uma técnica padronizada de PCR pelo Ministério da Saúde (GONTIJO; MELO, 2004; QUEIROZ et al., 2010).

3.1.1.3 Diagnóstico Sorológico

Técnicas sorológicas para o diagnóstico de LVC têm sido amplamente utilizadas por serem menos invasivas, passíveis de serem aplicadas a um grande número amostral e fundamentadas na hipergamaglobulinemia observada em cães infectados por *L. infantum* (ALVAR et al., 2004; FONSECA et al., 2014). O diagnóstico é confirmado frente ao encontro de anticorpos anti-*Leishmania* ou antígenos do parasita no soro do animal infectado. Dentre as técnicas sorológicas mais utilizadas, atualmente, estão a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) cuja sensibilidade e especificidade variam entre 73-100% e 69,1-100%, respectivamente (ALMEIDA et al., 2005; DA SILVA et al., 2013; LAURENTI et al., 2014) e a reação de imunoadsorção enzimática (ELISA) que apresenta sensibilidade e especificidade variáveis de acordo com o antígeno utilizado (GOMES et al., 2008; MIRÓ et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; LAURENTI et al., 2014).

No Brasil, o Ministério da Saúde determinou o teste rápido imunocromatográfico Dual Path Platform – TR-DPP® (Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brasil) com uma fusão dos antígenos recombinantes rK9, rK26 e rK39, como forma de triagem dos animais suspeitos (BRASIL, 2011; FONSECA et al., 2014). As amostras reagentes são encaminhadas para confirmação do diagnóstico por meio da reação de imunoadsorção enzimática (ELISA - Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brasil), a qual utiliza antígenos brutos solúveis de *L. major-like*, agente etiológico da leishmaniose tegumentar no Velho Mundo (BRASIL, 2011; 2014; FONSECA et al., 2014).

A utilização de antígenos brutos solúveis do parasita no ELISA apresenta alta sensibilidade e baixa especificidade devido à proximidade antigênica de *Leishmania* sp. a outros protozoários patogênicos que apresentam epítomos semelhantes (FERREIRA et al., 2007). Ferreira et al. (2007) ao analisarem amostras de soro de cães de área endêmica para LVC observaram valores de sensibilidade e especificidade de 100% e 96%, respectivamente, utilizando o teste ELISA (Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brasil) e relataram reações cruzadas com os patógenos *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* e *Ehrlichia canis*. Da mesma forma, Alves et al. (2012) também observaram reação cruzada com tripanossomatídeos, ao testarem soros

de cães infectados com *Trypanosoma caninum* no ELISA (Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brasil) e observaram valores de sensibilidade e especificidade de 100% e 68%, respectivamente, utilizando amostras de cães sabidamente infectados para LVC, cães infectados com *T. caninum* e cães negativos para LVC e *T. caninum*. Contrariamente, Lira et al. (2006) não observaram reações cruzadas no ELISA (Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brasil) com os parasitas testados em seu estudo (*Babesia canis*, *Anaplasma platys* e *Demodex canis*) e, relataram sensibilidade e especificidade de 72% e 87,5%, respectivamente.

Portanto, apesar do avanço tecnológico nos testes disponíveis para diagnóstico, ainda se observa cães assintomáticos falsos negativos ou cães falsos positivos devido a reações cruzadas em soros de animais que apresentem outras hemoparasitoses como tripanossomíases, erlichioses, riquetsioses, toxoplasmose ou ainda por serem vacinados contra LVC (GONTIJO; MELO, 2004; FERREIRA et al., 2007; GOMES et al., 2008; SANTOS et al., 2014; NUNES et al., 2015).

Teixeira et al. (2007) ao analisarem amostras de pacientes humanos com LVA não encontraram nenhum antígeno do extrato de *L. infantum* que fosse reconhecido por anticorpos em todos os soros. Devido a essa problemática, enfatiza-se a necessidade de identificar antígenos que direcionem a resposta imune celular a *L. infantum*. Frente a estes questionamentos e a possibilidade de clonar genes codificantes de proteínas antigênicas de *L. infantum*, novos antígenos recombinantes têm sido explorados como alvo individual ou em associação, visando averiguar seu potencial no diagnóstico sorológico de LVA (GOMES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011; FONSECA et al., 2014).

A proteína de membrana dos cinetoplastídeos de 11KDa (KMP-11), é tida como bom marcador para cinetoplastídeos e responsável pela estimulação de células T, porém de caráter imunodominante de células B. Assim, a proteína de superfície de promastigota de *L. infantum* KMP-11 é adequada ao diagnóstico sorológico de LVA em locais onde não há relatos de coinfeção por outros cinetoplastídeos, visto que foi reconhecida por 96% dos soros de cães e 70% dos soros de pacientes humanos testados (BERBERICH et al., 1997).

As proteínas ribossomais ácidas LiP2a, LiP2b e LiP0 são proteínas altamente conservadas de *L. infantum*, sendo consideradas antígenos proeminentes durante a infecção (SOTO et al., 1995a,b). As proteínas LiP2a e LiP2b reagiram com anticorpos presentes em 88% e 100% das amostras sorológicas de cães com LVC, respectivamente; não manifestaram reatividade com *T. cruzi* e resultados similares foram observados ao serem testadas em humanos com LVA (SOTO et al., 1995a). Em outros estudos, Soto et al. (1995b) observaram que 78% dos soros de cães com LVC reagiram à proteína LiP0 e Skeiky et al. (1994) relataram que 90,5% dos soros de humanos com LVA reconheceram esta proteína recombinante, embora tenha ocorrido reação cruzada com pacientes portadores de doença de Chagas. Assim, as proteínas ácidas ribossomais apresentam a capacidade de provocar intensa resposta imune humoral em cães e humanos e, conseqüentemente, demonstram potencial para o diagnóstico de LVC e LVA (SKEIKY et al., 1994; REQUENA et al., 2000).

A proteína nucleossomal H2A de *L. infantum* é considerada um potente imunógeno durante a infecção canina por ser alvo da resposta imune humoral destes animais e reconhecida em 78% dos soros de cães naturalmente infectados por LVC (SOTO et al., 1995c). O fato dos anticorpos produzidos serem específicos contra histonas do parasita e não haver reação com histonas de mamíferos reforçam sua importância; ainda que se observe reação cruzada entre as histonas H2A de *T. cruzi* e *L. infantum* devido à similaridade de sequências entre ambas (SOTO et al., 1995c). Da mesma maneira, a proteína nucleossomal H3 tem mostrado potencial como ferramenta para o diagnóstico de LVC por induzir resposta humoral específica e por sua forma recombinante ter sido reconhecida em 81% dos cães com LVC; além de aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes quando comparados com o uso da histona em sua integridade (SOTO et al., 1996). As proteínas antigênicas das histonas H2A e H3 também apresentam resultados

promissores no reconhecimento de crianças portadoras de LVA com especificidades de 91% e 92%, respectivamente, e sensibilidade de 100% (MAALEJ et al., 2003).

Já as proteínas de choque térmico HSP70 e HSP83 de *L. infantum* mostraram bom desempenho no diagnóstico sorológico de LVC ao reagirem em 100% e 90% dos soros caninos com LVC testados, respectivamente (ANGEL et al., 1996; QUIJADA et al., 1996). Estas proteínas são auspiciosas no diagnóstico da manifestação humana, visto que a forma recombinante de HSP83 demonstrou 100% de sensibilidade na detecção da enfermidade e 100% de especificidade quando testada nas amostras de pacientes chagásicos (CELESTE et al., 2014). Assim como a presença de anticorpos contra HSP70 em soros de pacientes humanos tem sido reportada, não se observa reação cruzada com *T. cruzi* (ANDRADE et al., 1992).

Neste cenário, considera-se a necessidade de explorar o potencial destas proteínas em estudo clínico que permita a avaliação prática do desempenho no diagnóstico de LVC em amostras recrutadas de acordo com parâmetros clínicos definidos.

3.2 Vetores

Os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), dípteros de pequeno porte (2 a 3mm de comprimento), são caracterizados por densa pilosidade revestindo seu corpo, de coloração variando entre castanho claro a cinza escuro, tórax arqueado, pernas longas e asas lanceoladas que se mantêm eretas no dorso mesmo durante o pouso (FORATTINI, 1973; BRAZIL; BRAZIL, 2003). Apresentam hábito preferencialmente crepuscular e noturno, escolhem o habitat natural de acordo com o clima, umidade, luminosidade, corrente de ar e a presença de matéria orgânica em decomposição. Estes insetos tendem a ficar próximo de seus criadouros ou locais de abrigo, porém já foram capturados até cerca de 1 km do ponto de soltura (ALEXANDER, 1987; CHANIOTIS et al., 1974; DIAS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2012).

Chamados popularmente de cangalhinha, asa branca, asa dura, birigui, mosquito palha, tatuquira, entre outros, as fêmeas destes insetos são as responsáveis pela transmissão de *Leishmania* spp. ao realizarem o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado (GRIMALDI; TESH, 1993; BRAZIL; BRAZIL 2003).

As formas amastigotas, intracelulares e presentes nas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado são ingeridas pelas fêmeas de flebotomíneos durante a hematofagia, a qual é necessária para o desenvolvimento ovariano destes insetos (FORATTINI, 1973; BRAZIL; BRAZIL, 2003). Estas formas imóveis se transformam em promastigotas flageladas no interior do organismo do hospedeiro invertebrado e, durante um novo repasto sanguíneo, são transmitidas a um hospedeiro vertebrado suscetível sob a forma de promastigotas metacíclicas. As formas flageladas atingem a corrente sanguínea do hospedeiro, onde são fagocitadas por macrófagos e diferenciam-se em amastigotas. Após a multiplicação do parasita, as células do sistema fagocítico mononuclear se rompem, liberando as amastigotas, as quais invadem novas células ou são fagocitadas, disseminando a infecção por meio da migração de macrófagos infectados e de parasitas livres pelo sistema vascular (ETTINGER; FELDMAN, 1997; ROSYPAL et al., 2003).

No Brasil, duas espécies de flebotomíneos estão, comprovadamente, envolvidas na transmissão do agente etiológico da forma viscerotrópica de leishmaniose, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; OLIVEIRA et al., 2017a,b). A espécie *Lu. longipalpis* apresenta alta antropofilia, distribuição espacial coincidindo com casos humanos da doença e infecção natural, com ampla distribuição geográfica no país, com ocorrência tanto em áreas silvestres e rurais, como em áreas periféricas e urbanas (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; RANGEL; VILELA, 2008; SOUZA et al., 2009), a exemplo do município de Campo Grande, onde tem sido encontrada em toda extensão da cidade, incluindo a região central, o que reflete a adaptação desta espécie a ambientes antropizados e modificados (OLIVEIRA et al., 2003; SILVA et al., 2008).

Frente à presença de evidências epidemiológicas de LV, tais como a ocorrência de casos humanos e caninos da doença em algumas regiões do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul onde não há presença do vetor *Lu. longipalpis*, o encontro prévio de formas flageladas do parasito em fêmeas da espécie *Lu. cruzi* e sua recente comprovação de competência vetorial (OLIVEIRA et al., 2017a, b), *Lu. cruzi* é considerada espécie vetora do parasita no estado de Mato Grosso do Sul, nos municípios de Corumbá e Ladário (GALATI et al., 1997; RANGEL; VILLELA, 2008; OLIVEIRA et al., 2008; MISSAWA et al., 2011; BRAZIL, 2013; CASARIL et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017a, b). Além disso, o município de Camapuã é localidade-tipo da espécie *Lu. cruzi*, a qual é relatada como antropológica (MANGABEIRA, 1938; WILLIAMS; CARVALHO, 1979) e está presente em áreas urbanizadas do município (FERNANDES, et al., 2017).

3.3 Epidemiologia

3.3.1 Leishmaniose visceral americana em Campo Grande

Presente desde 1911 no município de Corumbá, no Estado de Mato Grosso do Sul, a LVA se espalhou na década de 1990 para outras localidades, dentre as quais se inclui o município de Campo Grande (OLIVEIRA et al., 2006; ANTONIALLI et al., 2007; FURLAN, 2010), localizado geograficamente na porção central do Estado, com extensão territorial de 8.118,4 km², o que representa 2,27% da área total do Estado (IBGE, 1991).

Em 1998, confirmou-se o primeiro caso canino autóctone de LV em Campo Grande, época em que foi realizado inquérito canino sorológico com 6.204 cães de diferentes pontos da cidade e observou-se que 1,3% destes foram soropositivos (SILVA et al., 2000; FURLAN, 2010). No ano seguinte, identificou-se pela primeira vez o vetor *Lu. longipalpis* na área urbana do município (OLIVEIRA et al., 2000) e em 2001 foi notificado o primeiro caso humano autóctone da doença, marcando o início da epidemia, com 19 casos humanos diagnosticados neste período (OLIVEIRA et al., 2006; FURLAN, 2010, BRASIL, 2017).

Nos anos de 2002 a 2006 foram registrados e confirmados no total 568 casos humanos de LVA em Campo Grande, com uma estimativa de incidência que variou de 3,1 casos/100.000 habitantes no ano de 2002 até o máximo de 21,3 casos/100.000 habitantes, registrado em 2006. Já nos inquéritos sorológicos caninos realizados neste mesmo período de tempo, foram examinadas amostras de 11.642 cães, dos quais 25,3% foram soropositivos (FURLAN, 2010).

Obedecendo às medidas de controle recomendadas pelo Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose, a borrifação de imóveis com inseticidas foi iniciada no ano de 2003 e foram borrifados até 2006, 463.232 imóveis no total (FURLAN, 2010).

Nos anos de 2007 a 2013, a quantidade de casos humanos de LVA notificados em Campo Grande de acordo com Sistema de Agravos e Notificações (SINAN) manteve-se acima de 150, com registros mais elevados nos anos de 2012 e 2013, com 255 e 197 casos notificados respectivamente (BRASIL, 2017). Ainda em 2012 foi realizado o último e mais recente inquérito sorológico canino, no qual a prevalência observada foi de 22,37% (PMCG, 2012).

O coeficiente de incidência da doença por 100.000 habitantes no município reduziu nos anos seguintes, passando de 19 em 2012, ano em que o número de notificações foi maior, para 17 em 2013, 9 em 2014 e 7 em 2015 (MATO GROSSO DO SUL, 2012; 2016). No ano de 2017, foram registrados 31 casos até 18 de julho e, desta forma, o município de Campo Grande continua classificado como área de transmissão intensa para LV (MATO GROSSO DO SUL, 2017).

3.3.2 Leishmaniose visceral americana em Camapuã

O município de Camapuã, localizado a 140 km da capital do estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, era considerado área receptiva à LVA até 2007, ano em que ocorreram os dois primeiros casos humanos da enfermidade (BRASIL, 2017).

Devido ao surgimento de casos da doença, no ano seguinte, foi realizada investigação entomológica em residências da cidade, na qual a espécie de flebotomíneo predominantemente encontrada foi *Lu. cruzi*. Neste ano de 2008 foram notificados três casos humanos da doença e frente ao aumento na incidência de casos foi realizado no ano de 2009 o primeiro inquérito sorológico canino, no qual a prevalência observada foi de 51,05% (CAMAPUÃ, 2015; BORGES, 2017; BRASIL, 2017).

Entre 2010 e 2011, um caso humano de LVA foi registrado em cada ano, e os inquéritos sorológicos demonstraram uma redução na prevalência da enfermidade entre os cães, com valores de 17,93% e 11,94% respectivamente (CAMAPUÃ, 2015; BORGES, 2017; BRASIL, 2017).

Durante os anos de 2012 e 2014 não foram registrados casos humanos de LVA, entretanto em 2013 foram registrados três casos e por este motivo um novo inquérito sorológico canino foi realizado, no qual observou-se prevalência de 13,95% em 2014 (CAMAPUÃ, 2015; BORGES, 2017; BRASIL, 2017). Em 2015, a LVA voltou a ser notificada em Camapuã devido à ocorrência de um caso humano. Neste mesmo ano, o último e mais recente inquérito epidemiológico canino foi realizado e revelou prevalência de 13,54% (BORGES, 2017). O município de Camapuã, localizado próximo a municípios de transmissão intensa de LVA e rota para a capital do estado, é atualmente classificado como área de transmissão esporádica de *L. infantum* (BRASIL, 2017; MATO GROSSO DO SUL, 2017).

4. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, E.; LAINSON R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, cap.3, p.207-255, 2003.
- ALEXANDER, J. B. Dispersal of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian Coffee Plantation. **Journal of Medical Entomology**, v. 24, p. 552-558, 1987.
- ALMEIDA, M. A.; JESUS, E. E.; SOUZA-ATTA, M. L. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary parasitology**, v.127, p.227-232, 2005.
- ANTONIALLI, S. A. C., TORRES, T. G.; PARANHOS FILHO, A. C.; TOLEZANO, J. E. Spatial analysis of american visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, central Brazil. **Journal of Infection**, v. 54(5), p.509-514, 2007.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.57, p. 1-88, 2004.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANIN, J.; DEN BOER, M.; WHO, L.C.T. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLOS ONE**, v. 7 (5), p.e35671, 2012.
- ALVES, A. S.; MOUTA-CONFORT, E.; FIGUEIREDO, F. B.; OLIVEIRA, R. V. C.; SCHUBACH, A. O.; MADEIRA, M. F. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 1329-1333, 2012.

- ANDRADE, C. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E.; OTSU, K. Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not chagas' disease patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30 (2), p.330-335, 1992.
- ANGEL, S. O.; REQUENA, J. M.; SOTO, M.; CRIADO, D.; ALONSO, C. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. **Acta Tropica**, v.62, p.45-56, 1996.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v.14, p. 523-532, 1996.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v.30 (12), p.1269–1281, 2000.
- BARBOSA, E. B.; VIDOTTO, A.; POLACHINNI, G. M.; HENRIQUE, T.; MARQUI, A. B. T.; TAJARA, E. H. Proteômica: Metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.58 (3), p.355-375, 2012.
- BARROUIN-MELO, S. M.; LARANJEIRA, D. F.; TRIGO, J.; AGUIAR, P. H. P.; DOS-SANTOS, W. L. P.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99 (2), p. 195-197, 2004.
- BERBERICH, C. R.; REQUENA, J. M.; ALONSO, C. Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. **Experimental parasitology**, v. 85, p.105-108, 1997.
- BORGES, L. M. **Aspectos zoonóticos da leishmaniose visceral em Camapuã, MS**. 58 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2017.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Nota Técnica Conjunta nº 01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. **Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC)**. (Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública). Brasília. Ministério da Saúde, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Leishmaniose visceral: casos confirmados e notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação: Mato Grosso do Sul. Acesso em janeiro de 2017. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinanet/cnv/leishvMS.def>>
- BRAZIL, R. P; BRAZIL, B. G. Biologia de Flebotomíneos Neotropicais. In: RANGEL, E.; LAINSON R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Ed. Fio Cruz, Rio de Janeiro, p. 257-274, 2003.
- BRAZIL, R. P. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 1-2, 2013.
- CABRERA, M. A. A. **Ciclo enzoótico da transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* CUNHA & CHAGAS, 1937 no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de**

Janeiro, RJ: Estudo de possíveis variáveis preditoras. Tese (Magister Scientiae), Escola de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, 1999. 90 p.

CARREGAL, V. M. **Comparação de métodos de PCR e amostras clínicas para o diagnóstico de leishmaniose visceral em cães assintomáticos.** 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações) - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte. 2011.

CASARIL, A. E.; MONACO, N. Z. N.; OLIVEIRA, E. F.; EGUCHI, G. U.; PARANHOS FILHO, A. C.; PEREIRA, L. E.; OSHIRO, E. T.; GALATI, E. A. B.; MATEUS, N. L. F.; OLIVEIRA, A. G. Spatiotemporal analysis of sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in an endemic area of visceral leishmaniasis at Pantanal, central South America. **Parasites & Vectors**, v. 7 (364), 2014. doi: 10.1186/1756-3305-7-364

CAMAPUÃ. Prefeitura Municipal. Secretaria Municipal de Saúde. Prevalência canina de leishmaniose visceral entre os anos de 2009 e 2015 no município de Camapuã, MS. Relatório. Camapuã, 2015.

CELESTE, B. J.; SANCHEZ, M. C. A.; RAMOS-SANCHEZ, E. M.; CASTRO, L. G. M.; COSTA, F. A. L.; GOTO, H. Recombinant *Leishmania infantum* heat-shock protein 83 for the serodiagnosis of cutaneous, mucosal and visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.90 (5), p.860-865, 2014.

CHANLOTIS, B. N.; CORREA, M. A.; TESH, R. B.; JOHNSON, K. M. Horizontal and vertical movements of Phlebotomine sandflies in a Panamanian rain forest. **Journal of Medical Entomology**, v. 11(3), p. 369-375, 1974.

DA COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; GONTIJO, F. N.; MICHALICK, M. S.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N.; Canine visceral leishmaniasis relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia longipalpis* infectivity. **Veterinary Journal**, v.174, p. 636-643, 2007.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO S.P. Expansão Geográfica da Leishmaniose Visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, p.352–356, 2006.

DA SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; ABRANTES, T. R.; FILHO, C. J.; FIGUEIREDO, F. B. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Journal**, v.195, p. 252-253, 2013.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica do calazar, no Ceará. **O Hospital**, v.48, p. 61-76, 1955.

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

DIAS, E. S.; FRANÇA-SILVA, J. C.; SILVA, J. C.; MONTEIRO, E. M.; PAULA, K. M.; GONÇALVES, C. M.; BARATA, R. A. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40 (1), p. 49-52, 2007.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Sistema Gastrointestinal – Seção X. In: **Tratado de Medicina Interna Veterinária**; Editora Manole, 4 ed., v. 2, São Paulo, 1997.

- FERREIRA, E. C.; LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; SILVA, E. S.; SCHALLING, H.; GONTIJO, C. M. F. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v.146, p.235-241, 2007.
- FERREIRA, S. A.; ITUASSU, L. T.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S. R. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.152, p. 257-263, 2008.
- FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: **Proceedings of the international canine leishmaniasis forum**. Barcelona, Spain. Canine Leishmaniasis: an update. Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet, p. 6-10, 1999.
- FERNANDES, W. S.; BORGES, L. M.; CASARIL, A. E.; OLIVEIRA, E. F.; INFRAN, J. O. M.; PIRANDA, E. M.; OSHIRO, E. T.; GOMES, S. P.; OLIVEIRA, A. G. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in na urban area, Central-West of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2017; 59:e54, 2017.
- FONSECA, A.M.; FARIA, A.R.; RODRIGUES, F.T.G.; NAGEM, R.A.P.; MAGALHÃES, R.D.M.; CUNHA, J.L.R.; BARTHOLOMEU, D.C.; ANDRADE, H.M. Evaluation of three recombinant *Leishmania infantum* antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Tropica**, v.137, p.25-30, 2014.
- FORATTINI, O. P. **Entomologia médica**. Psychodidae, phlebotominae, leishmanioses, bartonelose, São Paulo: Edgar Blücher, 1973.
- FURLAN, M. B. G. Epidemia de leishmaniose visceral no município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 19 (1), p.15–24, 2010.
- GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; REGO-JR, F. A.; OSHIRO, E. T.; RODRIGUES, M. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31 (4), p. 378-390, 1997.
- GOMES, Y. M., CAVALCANTI, M. P., LIRA, R. A., ABATH, F. G. C., ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, v.175, p.45-52, 2008.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7 (3), p. 338-349, 2004.
- GRIMALDI, J. R.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Review**, v.361 (3), p.230-250, 1993.
- GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELART, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, p.494-501, 2002.
- IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística).1991. **Censo Demográfico. Resultados do Universo Relativos às Características da População e dos Domicílios. Número 25, Mato Grosso do Sul**. Rio de Janeiro: IBGE.

LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; MATTA, V. L. R.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196 (3-4), p. 296-300, 2013.

LAURENTI, M. D.; JUNIOR, M. V. S. L.; TOMOKANE, T. Y.; DE LUCCA, H. L. R.; ASCHAR, M.; SOUZA, C. S. F.; SILVA, R. M.; MARCONDES, M. DA MATTA, V. L. R. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 2015, p. 444-450, 2014.

LIRA, R. A.; CAVALCANTI, M. A.; NAKAZAWA, M.; FERREIRA, A. G. P.; SILVA, E. D.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C.; SOUZA, W. V.; GOMES, Y. M. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, v. 184 (1), p. 10-17, 2012.

LOMBARDO, G.; PENNISI, M. G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; CAPRI, A.; SOLANO-GALLEGÓ, L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 11-16, 2006.

LOPES, E.G. **Atributos diagnósticos da reação em cadeia pela polimerase com oligonucleotídeos iniciadores direcionados a genoma de cinetoplasto e nuclear de *Leishmania* spp.** 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MAALEJ, I. A.; CHENIK, M.; LOUZIR, H.; BEN SALAH, A.; BAHLOUL, C.; AMRI, F.; DELLAGI, K. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68 (3), p. 312-320, 2003.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v.158, p. 274-287, 2008.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T.; MOTA, T. F.; PORFIRIO-PASSOS, G.; LARANJEIRA, D. F.; FRANKE, C. R.; BARROUIN-MELO, S. M. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. **Veterinary Parasitology**, v.223, p.120-126, 2016.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.82, p.566-567, 1988.

MANGABEIRA FILHO, O. Sobre duas novas espécies de Flebótomo (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 33 (3), p. 349-365, 1938.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, p. 359-375, 1994.

MATO GROSSO DO SUL. Secretaria de Estado de Saúde. Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica. Gerência Estadual de Zoonoses. **Informe epidemiológico das leishmanioses nº 4/2012**. 2012.

MATO GROSSO DO SUL. Secretaria de Estado de Saúde. Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica. Gerência Estadual de Zoonoses. **Informe epidemiológico das leishmanioses nº 1/2016**. 2016.

MATO GROSSO DO SUL. Secretaria de Estado de Saúde. Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica. Gerência Estadual de Zoonoses. **Informe epidemiológico das leishmanioses nº 5/2017**. 2017.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in parasitology**, v. 24, p.371-377, 2008.

MISSAWA, N. A.; VELOSO, M. A. E.; MACIEL, G. B. M. L.; MICHALSKY, E. M.; DIAS, E. S. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44 (1), p. 76-78, 2011.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRÉS, M.; GONZÁLEZ, F.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.88, p.491-493, 1994.

MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p.245-252, 2007.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v.18 (9), p.399-405, 2002.

NUNES, C. M.; DE LIMA, V. M. F.; DE MELO, G. D.; DE PAULA, H. B.; PEREIRA, M. E. G.; TRONCO, C. M. T.; HIRAMOTO, R. M.; LAURENTI, M. D.; BURATTINI, M. N. Serological, parasitological and molecular tests for canine visceral leishmaniosis diagnosis in a longitudinal study. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.24 (4), p.402-409, 2015.

OLIVEIRA, A. G.; FALCÃO, A. L.; BRAZIL, R. P. Primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) na área urbana de Campo Grande, MS. **Revista de Saúde Pública**, v.34, p. 654-655, 2000.

OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE FILHO, J. D.; FALCÃO, A. L.; BRAZIL, R. P. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da Cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19 (4), p. 933-944, 2003.

OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A. B.; OLIVEIRA, O.; OLIVEIRA, G. R. O.; ESPINDOLA, A. R.; DORVAL, M. E. C.; BRAZIL, R. P. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101 (8), p. 869-874, 2006.

OLIVEIRA, A. G.; MARASSÁ, A. M.; CONSALES, C. A.; DORVAL, M. E. C.; FERNANDES, C. E.; OLIVEIRA, G. R.; BRAZIL, R. P.; GALATI, E. A. B. Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo

Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Tropica**, v. 107, p. 238-241, 2008.

OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A. B.; FERNANDES, C. E.; DORVAL, M. E. C.; BRAZIL, R. P. Ecological aspects of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in endemic area of visceral leishmaniasis, Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 49 (1), p. 43-50, 2012.

OLIVEIRA, E. F.; OSHIRO, E. T.; FERNANDES, W. S.; FERREIRA, A. M. T.; OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A. B. Vector competence of *Lutzomyia cruzi* naturally demonstrated for *Leishmania infantum* and suspected for *Leishmania amazonensis*. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96 (1), p.178-81, 2017a.

OLIVEIRA, E. F.; OSHIRO, E. T.; FERNANDES, W. S.; MURTA, P. G.; MEDEIROS, M. J.; SOUZA, A. I.; OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A. B. Experimental infection and transmission of Leishmania by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 11(2), e0005401, 2017b. doi:10.1371/journal.pntd.0005401.

OLIVEIRA, G. G. S.; MAGALHÃES, F. B.; TEIXEIRA, M. A. C.; PEREIRA, A. M.; PINHEIRO, C. G. M.; SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, M. B.; BEDOR, C. N. G. B.; ALBUQUERQUE, A. L.; DOS-SANTOS, W. L. C.; GOMES, Y. M.; MOREIRA JR, E. D.; BRITO, M. E. F.; DE CARVALHO, L. C. P.; NETO, O. P. M. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinctive capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85 (6), p. 1025-1034, 2011.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DOS SANTOS, V. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65 (5), p. 510-517, 2001.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L. A. R.; SANTOS, W. C.; GRIMALDI, JR-G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.55, p.39-44, 1996.

PEIXOTO, H. M.; OLIVEIRA, M. R. F.; ROMERO, G. A. S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systemic review and meta-analysis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 20 (3), p.334-352, 2015.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNARDINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62 (1), p.229-235, 1994.

PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPO GRANDE. SECRTARIA MUNICIPAL DE SAÚDE PÚBLICA. Diretoria de vigilância em saúde. Coordenadoria de Controle em Zoonoses. Serviço de Controle de Raiva e outras Zoonoses. **Relatório anual**. Campo Grande, MS, 2012.

QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos e associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19 (1), p. 32-38, 2010.

QUIJADA, L.; REQUENA, J. M.; SOTO, M.; ALONSO, C. During canine viscerocutaneous leishmaniasis the anti-Hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. **Parasitology**, v.112, p.277-284, 1996.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J. J.; SHAW, M. A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v.122, p.253-261, 2001.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24 (12), p. 2948-2952, 2008.

REQUENA, J. M.; ALONSO, C.; SOTO, M. Evolutionary conserved proteins and prominent immunogens during *Leishmania* infections. **Parasitology Today**, v.16, p.246-250, 2000.

ROSYPAL, A. C.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY, D. S. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 33, 921-937, 2003.

SANTA ROSA I. C. A.; OLIVEIRA I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, v. 11, p. 24-28, 1997.

SANTOS, T. R.; CARREIRA, V. S.; FERRARI, H. F.; MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R. Comparison of PCR with stained slides of bone marrow and lymph nodes aspirates with suspected diagnosis for leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.140, p.137-140, 2014.

SILVA, E. S.; OLIVEIRA, A. G.; CARVALHO, F. G.; SILVA, E. A.; FRIOZI, E.; FARIAS. Primeiro relato de leishmaniose visceral canina em área urbana do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Resumos do 36º Congresso Brasileiro de Medicina Tropical**. Fevereiro.20-24; São Luís, MA. Brasília. 2000.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; DIAS, E. S.; BARROS, J. C.; BRAZUNA, J. C. M. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 343-348, 2008.

SILVA, K. R.; MENDONÇA, V. R. R.; SILVA, K. M.; NASCIMENTO, L. F. M.; MENDES-SOUSA, A. F.; de PINHO, F. A.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A. M. P.; CRUZ, M. S. P. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112 (1), p. 53-62, 2017.

SKEIKY, Y.A.W.; BENSON, D.R.; ELWASILA, M.; BADARO, R.; BURNS JR, J.M.; REED, S.G. Antigens shared by *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*: immunological comparison of the acid ribosomal P0 proteins. **Infection and Immunity**, v. 62 (5), p.1643-1651, 1994.

SOARES, M. R. A.; MENDONÇA, I. L.; BONFIM, J. M.; RODRIGUES, J. A.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. N. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Tropica**, v.117, p. 6-9, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, 165, p.1-18, 2009.

SOTO, M.; REQUENA, J. M.; QUIJADA, L.; ANGEL, S.O.; GOMEZ, L.C.; GUZMAN, F. During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 100, p. 246-252, 1995a.

SOTO, M.; REQUENA, J.M.; QUIJADA, L.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M.E.; ALONSO, C. Identification of the *Leishmania infantum* P0 ribosomal protein epitope in canine visceral leishmaniasis. **Immunology Letters**, v.48, p.23-28, 1995b.

SOTO, M.; REQUENA, J.M.; QUIJADA, L.; GARCIA, M.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E.; ALONSO, C. Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. **Immunology Letters**, v.48, p. 209-214, 1995c.

SOTO, M.; REQUENA, J. M.; QUIJADA, L.; GOMEZ, L. C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E.; ALONSO, C. Characterization of the antigenic determinants of *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. **Clinical & Experimental Immunology**, 1996.

SOUZA, G. G.; SANTOS, E.; ANDRADE-FILHO, J. D. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 (8), p.1181-1182, 2009.

TEIXEIRA, M. C. A.; OLIVEIRA, G. G. S.; SILVANY, M. A.; ALCÂNTARA-NEVES, N. M.; SOARES, M. B. P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; JERÔNIMO, S. M. B.; COSTA, C. H.; DOS-SANTOS, W. L. C.; EICHINGER, D.; PONTES-DE-CARVALHO, L. A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in genetic libraries. **Biologicals**. v.35, p.51-54, 2007.

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.64 (3,4), p.119-124, 2001.

VERÇOSA, B. L. A.; LEMOS, C. M.; MENDONÇA, I. L.; SILVA, S. M. M. S; DE CARVALHO, S. M.; GOTO, H.; COSTA, F. A. L. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BioMed Central Veterinary Research**, v.4 (45), p.1-7, 2008.

WEISS, J. B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, p.113-30, 1995.

WILLIAMS, P.; CARVALHO, A. L. Description of the female of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *dispar*, with a redescription of the male (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Journal of Medical Entomology**, v. 16 (4), p. 325-330, 1979.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disease Watch Focus: Leishmaniasis. 2007 In: TDR | Nature Reviews Microbiology. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/disease_watch/leish/en/>. Acesso em 20 de maio de 2016.

5. ARTIGO 1

Desempenho de proteínas recombinantes no diagnóstico da leishmaniose visceral canina em populações com diferentes perfis clínicos

Performance of recombinant proteins in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in populations with different clinical profiles

Nathália Lopes Fontoura Mateus¹, Leandro Machado Borges², Elisa Teruya Oshiro³, Jucelei de Oliveira Moura Infran³, Aline Etelvina Casaril³, Lucas Bezerra Taketa⁴, Karina Franco⁴, Alessandra Gutierrez de Oliveira^{3,5}, Maria do Socorro Pires e Cruz⁶ Eliane Mattos Piranda^{1,3*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, FAMEZ/UFMS, Mato Grosso do Sul, Brasil.

²Médico Veterinário da Secretaria Municipal de Saúde de Camapuã/MS - Setor de Zoonoses, Mato Grosso do Sul, Brasil.

³Laboratório de Parasitologia Humana, Inbio/UFMS, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁴Aluno de Iniciação Científica, UFMS, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁵Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias FAMED/UFMS, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁶Laboratório de Sanidade Animal, Departamento de Morfofisiologia Veterinária, UFPI, Piauí, Brasil.

Abstract

The diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL), zoonosis caused by the flagellated protozoan *Leishmania infantum*, is one of the major obstacles to its control. Nowadays, the Ministry of Health uses the immunochromatographic rapid test TR-DPP® as screening method for suspected dogs and the enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) as the confirmatory test. Aiming to increase the sensibility of ELISA, the diagnostic potential of the total soluble antigen of *L. infantum* (SLA) and antigenic recombinant proteins of *L. infantum* (KMP-11, LiP2a, LiP2b, LiP0, H2A, HSP70, HSP83) were accessed through an ELISA performed with samples with different clinical profiles (symptomatic animals diagnosed for CVL through direct parasitological examination; asymptomatic; negative animals for CVL; negative animals for CVL infected with other hemoparasites and negative animals for CVL vaccinated with Leishmune® or Leish-Tec®), from areas of intense (Campo Grande/MS) and sporadic (Camapuã/MS) transmission for human visceral leishmaniasis. The cutoff point of each antigen was established using the optical density of each sample, considering the ROC-AUC, based on the higher sensitivity and specificity obtained. Among the recombinant proteins tested, HSP70 and LiP2a were significantly better ($p < 0,001$) to differentiate infected animals (symptomatic and asymptomatic) from negative animals (vaccinated, negatives and negatives with hemoparasitosis). Besides that, they were the only proteins able to differentiate ($p < 0,05$) negative animals from asymptomatic ones. The recombinant proteins HSP70 and HSP83 and the total soluble antigen (SLA) showed difference ($p < 0,001$) among the samples of infected animals from Campo Grande and Camapuã. We suggest the investigation of the antigens HSP70 and LiP2a, used in combination in ELISA, to obtain a confirmatory test of sensitivity, specificity and, reproducibility higher than the currently used test.

Keywords: ELISA, *Leishmania infantum*, serology.

Resumo

O diagnóstico preciso da leishmaniose visceral canina (LVC), zoonose causada pelo protozoário flagelado *Leishmania infantum*, é um dos maiores entraves para seu controle.

Atualmente, o Ministério da Saúde utiliza o teste rápido imunocromatográfico TR-DPP® como triagem dos animais suspeitos e a reação de imunoabsorção enzimática (ELISA) como técnica confirmatória. Com o intuito de aumentar a sensibilidade desta última, foi avaliado o potencial diagnóstico do antígeno solúvel total de *L. infantum* (SLA) e de proteínas antigênicas recombinantes de *L. infantum* (KMP-11, LiP2a, LiP2b, LiP0, H2A, HSP70, HSP83) no teste ELISA utilizando amostras com perfis clínicos diferentes (animais sintomáticos diagnosticados para LVC através do exame parasitológico direto; assintomáticos; animais negativos para LVC; animais negativos para LVC e infectados com outros hemoparasitas e animais negativos para LVC vacinados com as vacinas Leishmune® ou Leish-Tec®) provenientes de áreas de transmissão intensa (Campo Grande/MS) e esporádica (Camapuã/MS) para leishmaniose visceral humana. O ponto de corte de cada antígeno foi estabelecido utilizando a densidade óptica de cada amostra aplicada à curva ROC, baseado na maior sensibilidade e especificidade obtidas. Dentre as proteínas recombinantes testadas, HSP70 e LiP2a foram as melhores em diferenciar significativamente os animais infectados (sintomáticos e assintomáticos) dos negativos (vacinados, negativos com hemoparasitas e negativos) ($p < 0,001$) e foram as únicas capazes de distinguir este último grupo de animais assintomáticos ($p < 0,05$). As proteínas recombinantes HSP70 e HSP83 e o antígeno solúvel bruto (SLA) detectaram diferença entre as amostras de animais infectados provenientes de Campo Grande e Camapuã ($p < 0,001$). Sugere-se a investigação dos antígenos HSP70 e LiP2a, utilizados de forma combinada no ELISA, com o intuito de obter um teste confirmatório de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade superior ao teste atualmente utilizado.

Palavras-chave: ELISA, *Leishmania infantum*, sorologia.

Introdução

A leishmaniose visceral americana (LVA) é uma antroponose reemergente causada pelo protozoário flagelado *Leishmania infantum*, transmitido durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos (Psychodidae: Phlebotominae) (GRIMALDI & TESH, 1993; ASHFORD, 2000; DESJEUX, 2004).

Esta enfermidade é a terceira doença infecciosa de prioridade no mundo de acordo com a Organização Mundial da Saúde, visto elevado indicador econômico DAILYs (“Disability-adjusted life years”) que infere os anos de vida produtiva perdidos por incapacidade ou morte prematura (WHO/TDR/2007). Endêmica em 98 países, no Brasil a LVA é relatada sob a forma de epidemias urbanas desde 1980 e atualmente está notificada nas cinco regiões do país (ALVAR et al., 2012; PEIXOTO et al., 2015; WERNECK, 2016).

No Brasil, o estado de Mato Grosso do Sul (MS) representa quase 4% dos casos da enfermidade registrados no país de 1990 a 2015 e teve apenas em 2017, 63 novas notificações de LVA registradas até 18 de julho (BRASIL, 2017; MATO GROSSO DO SUL, 2017). Além da elevada incidência, a taxa de letalidade no estado (8,3%) em 2015 foi maior que a média da região Nordeste (7,3%) do país, região mais afetada por esta protozoonose, demonstrando a gravidade e as condições de assistência e vigilância no MS (BRASIL, 2017).

Os cães desempenham um importante papel no ciclo epidemiológico da LVA; esta espécie é considerada o principal reservatório urbano da enfermidade devido ao elevado parasitismo cutâneo, mesmo quando assintomáticos (DEANE & DEANE, 1955; MOLINA et al., 1994; TRAVI et al., 2001; DA COSTA-VAL et al., 2007; VERÇOSA et al., 2008; SOARES et al., 2011; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016). Ademais, a enzootia canina usualmente precede os casos humanos, refletindo a importância do monitoramento da leishmaniose visceral canina (LVC) como um possível marcador de transmissão e (re)emergência de LVA (PARANHOS-SILVA et al., 1996; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016).

Por se tratar de uma doença de acometimento sistêmico e de complexa patofisiologia, a LVC apresenta manifestações clínicas bastante variáveis de acordo com a parasitemia, local de inoculação do parasita, competência imunológica do cão e estágio da doença; fatores que associados à compatibilidade destes sinais clínicos com outras enfermidades dificultam a realização do diagnóstico clínico (PINELLI et al., 1994; QUINNELL et al.,

2001; MORENO & ALVAR, 2002). Assim, o diagnóstico preciso da leishmaniose visceral canina é um dos maiores entraves para o controle desta zoonose.

No Brasil, o Ministério da Saúde determina a identificação dos cães soropositivos por meio de uma triagem utilizando o teste rápido imunocromatográfico (TR-DPP® Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brasil), e confirmação destes por meio da reação de imunoadsorção enzimática (ELISA), na qual os animais reagentes são destinados à eutanásia (BRASIL, 2011; 2014).

Devido à ausência de uma técnica com 100% de sensibilidade e especificidade, resultados falso-positivos e falso-negativos são observados nos exames sorológicos utilizados (GONTIJO & MELO, 2004). Desta forma, é necessário buscar métodos diagnósticos para LVC de maior acurácia; que permitam identificar precocemente a infecção em cães assintomáticos, assim como diferenciar cães vacinados e acometidos por outras enfermidades. Estes fatores são essenciais para evitar a manutenção de animais infectados no ambiente, a dispersão da doença e reduzir as eutanásias (FERREIRA et al., 2008; LAURENTI et al., 2014; NUNES et al., 2015; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016).

Frente a possibilidade de clonar genes codificantes de proteínas antigênicas de *L. infantum*, novos antígenos recombinantes têm sido explorados como alvo individual ou em associação, visando averiguar seu potencial no diagnóstico sorológico de LVA (GOMES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011; FONSECA et al., 2014). O uso de proteínas recombinantes pode trazer maior sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade aos exames sorológicos utilizados no diagnóstico da LVC (PASSOS et al., 2005; MAIA-ELKHOURY et al., 2008). No entanto, pouco se sabe sobre o desempenho destas proteínas antigênicas em cães com perfis clínicos diferenciados. Este trabalho tem como objetivo avaliar o uso das proteínas recombinantes de *Leishmania infantum* já descritas: KMP-11, LiP2a, LiP2b, LiP0, H2A, HSP70 e HSP83, bem como o antígeno bruto solúvel do parasita (SLA), no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães naturalmente infectados.

Material e Métodos

Aspectos éticos:

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob o protocolo número 645/2014 para os animais de Camapuã e 697/2015 para os animais de Campo Grande.

População de estudo:

O conjunto amostral deste estudo foi composto por cães procedentes de Campo Grande, município classificado pelo Ministério da Saúde como região de intensa transmissão para *L. infantum* e, Camapuã, município de transmissão esporádica. Em Campo Grande foram coletadas 200 amostras provenientes de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e de atendimentos particulares entre 2016 e 2017. Em Camapuã, as 288 amostras coletadas foram provenientes do inquérito sorológico epidemiológico do serviço de vigilância em saúde do município realizado em 2015. Os critérios de inclusão adotados neste estudo foram: animais residentes no município de Campo Grande/MS e Camapuã/MS com idade superior a quatro meses e cujos tutores consentiram com o termo de consentimento livre esclarecido.

Análise clínica:

Todos os cães foram examinados clinicamente para a classificação segundo Silva et al. (2017). Um conjunto de 15 diferentes sinais clínicos foram registrados para classificação dos cães conforme a presença ou gravidade dos sinais. De acordo com o escore total dos animais, estes foram classificados em assintomáticos (zero a três pontos) ou sintomáticos (mais de três pontos).

Coleta das amostras biológicas:

Para cada animal avaliado clinicamente foi coletada uma amostra de 10mL de sangue periférico com auxílio de tubos do tipo Vacutainer® por meio de venopunção jugular. A amostra foi armazenada em um frasco estéril com EDTA para pesquisa de

hemoparasitas por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e em outro tubo com ativador de coagulação para obtenção do soro.

Diagnóstico Sorológico de leishmaniose visceral canina: teste rápido imunocromatográfico TR-DPP®:

Foi utilizado o teste rápido imunocromatográfico TR-DPP® (Dual-Path Platform immunochromatographic test – Leishmaniose Visceral Canina, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ – Rio de Janeiro, Brasil) com amostra de soro de cada animal, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

Diagnóstico Parasitológico Direto:

A pesquisa direta de formas amastigotas do protozoário *Leishmania* spp. em esfregaços de aspirado de linfonodo foi realizada no Laboratório de Parasitologia Humana (Inbio/UFMS). As lâminas foram coradas com Giemsa e submetidos à visualização por meio de microscopia de campo claro com objetiva de 100x.

Diagnóstico das hemoparasitoses:

Apenas as amostras de sangue periférico com EDTA de cães negativos para LVC no exame parasitológico direto e exame sorológico foram destinadas à pesquisa de hemoparasitas por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), realizada no Laboratório de Biologia Molecular (Inbio/UFMS). As reações de PCR foram realizadas em três etapas, na seguinte ordem: primeiramente os animais foram submetidos à pesquisa de *Ehrlichia canis*; aqueles negativos na primeira etapa foram submetidos à pesquisa de *Babesia canis* e os animais negativos na segunda etapa foram submetidos à pesquisa de *Anaplasma platys*.

Obtenção dos controles positivos:

Os controles positivos para os agentes *B. canis* e *A. platys* foram padronizados e fornecidos pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista – campus de Jaboticabal. O controle positivo para o agente *E. canis* foi padronizado e fornecido pelo Laboratório de Biologia Molecular da

Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEZ) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Extração do DNA:

O material genômico (DNA total) presente em cada amostra foi extraído a partir de uma alíquota de 200µL de sangue coletado com EDTA e congelado (-20°C), utilizando-se o *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen™), de acordo com as especificações do fabricante. O DNA extraído foi aliquotado em tubos de polipropileno de 1,5mL estéreis, identificados e armazenados a -20° C, para utilização na PCR.

Técnica da Reação em cadeia da polimerase:

Nas reações de PCR, para um volume final de 25µL de reação foi adicionado: 5µL de amostra nas reações de PCR convencional e 1µL de DNA-amostra na reação de *nested* PCR (nPCR); 12,5µL de *GoTaq® Green Master Mix* (Promega®), 5,5µL de água nas reações de PCR convencional e 9,5µL nas reações de nPCR; e 1µL de cada oligonucleotídeo (diluídos para ter uma concentração final de 10pmol/µL, com exceção dos oligonucleotídeos para reação de *Anaplasma platys*, na qual a concentração final foi de 20pmol/µL). Todas as reações foram realizadas no termociclador Bio-Rad T100.

Gene betaglobina:

Esta etapa foi realizada com o objetivo de comprovar se a etapa de extração de DNA foi bem-sucedida, de forma a validar as amostras submetidas à PCR. Foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores nessa PCR: β globina (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3') e β globina 01 (5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3'). As condições de amplificação foram as seguintes: 95°C por 3 min., seguido de 34 ciclos de 95°C por 30 seg., 55°C por 30 seg. para anelamento e 72°C por 60 seg. para extensão. No último ciclo a extensão final foi realizada a 72°C por 5 min (adaptado de GREER et al., 1991).

Diagnóstico molecular de Ehrlichia canis:

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados são denominados ECC (senso ou “forward”) e ECB (anti-senso ou “reverse”) do gene 16S rRNA, os quais amplificam todas as *Ehrlichia* spp. (DAWSON et al., 1994; 1996) e fornecem um amplímero de aproximadamente 478 pares de bases. As seqüências desses oligonucleotídeos iniciadores são: ECC (5'-AGA ACG AAC GCT GGC GGC AAG C-3') e ECB (5'-CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC A-3') (DAWSON et al., 1994; 1996). As condições de amplificação durante a reação foram: 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C, 1 minuto a 72°C, com pós-extensão a 72°C por 5 minutos em termociclador (D'AGNONE, 2006). Após a PCR do gênero com ECC/ECB, foi realizada a reação de nested PCR (nPCR), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores derivados do gene 16S rRNA denominados “canis” (5'-CAA TTA TTT ATA GCC TCT GGC TAT AGG A-3') e GA1UR (5'-GAC TTT GCC GGG ACT TCT TCT-3') (WANER & DAWSON, 1996), os quais amplificam um amplímero de aproximadamente 358 pares de bases. As condições de amplificação durante a reação foram: 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C e pós-extensão a 72°C por 5 minutos em termociclador (D'AGNONE, 2006).

Diagnóstico molecular de Babesia canis:

Utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores denominados Piro-A (5'-AAT ACC CAA TCC TGA CAC AGG-3') e Piro-B (5'-TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC-3'), os quais amplificam um amplímero de aproximadamente 400 pares de bases, derivado do gene 18S rRNA para todas as espécies (CARRET et al., 1999). As condições de amplificação durante a reação foram adaptadas de D'agnone (2006): 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57,5°C, 1 minuto a 72°C e pós-extensão a 72°C por 5 minutos em termociclador.

Diagnóstico molecular de Anaplasma platys:

Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores denominados Platys -F (5'-AAG TCG AAC GGA TTT TTG TC-3') e Platys-R (5'-CTT TAA CTT ACC GAA CC-3'), os quais amplificam um amplímero de aproximadamente 503 pares de bases

(INOKUMA et al., 2002). As condições de amplificação durante a reação foram: 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 90 segundos a 72°C e pós-extensão de 72°C a 5 minutos em termociclador (D'AGNONE, 2006).

Eletroforese:

A identificação dos produtos amplificados foi feita por meio de eletroforese com gel de agarose a 1,5% em 100mL de Tris-Borato de EDTA (TBE), corados com Gel Red® e submetidos à corrida eletroforética a 100 volts por 100 min. Em solução tampão tris-borato EDTA (TBE) 1x. A visualização das bandas amplificadas sob incidência de luz ultravioleta, com filtro de 300 nm.

Formação dos Grupos Amostrais:

Após a realização do teste imunocromatográfico TR-DPP® e do exame parasitológico direto em todas as amostras, os animais negativos em ambos os testes foram submetidos à pesquisa de hemoparasitas com intuito de formar os seguintes grupos amostrais: A) cães sintomáticos diagnosticados com LVC pelo exame parasitológico direto; B) cães assintomáticos diagnosticados com LVC pelo exame parasitológico direto; C) cães vacinados com as vacinas Leish-Tec® (Hertape Saúde Animal S/A, Juatuba, Minas Gerais, Brasil) e/ou Leishmune® (Pfizer/Zoetis, Campinas, São Paulo, Brasil), com diagnóstico negativo para LVC (exame parasitológico direto e TR-DPP® negativos) e negativo para outras hemoparasitoses; D) cães diagnosticados com outras hemoparasitoses e diagnóstico negativo para LVC (exame parasitológico direto e TR-DPP® negativos); e E) animais negativos para outras hemoparasitoses e para LVC pelo exame parasitológico direto e TR-DPP®. Cada grupo foi composto por 45 animais, buscando igualdade no número de animais de cada região, ou foi definido de acordo com a prevalência do perfil acima descrito. Exceto o grupo C que não totalizou 45 animais. Assim, os grupos apresentaram a seguinte composição: A (16 animais de Camapuã/ 29 animais de Campo Grande); B (26 animais de Camapuã/ 19 animais de Campo Grande); C (12 animais vacinados de Campo Grande); D (23 animais de Camapuã/ 22 animais de

Campo Grande); E (23 animais de Camapuã/ 22 animais de Campo Grande). Assim, no total foram utilizados 192 animais para compor os grupos amostrais, selecionados de acordo com seus perfis clínicos e de maneira categorizada.

Avaliação do Desempenho das Proteínas antigênicas de L. infantum:

O desempenho das proteínas antigênicas de *L. infantum* foi avaliado por meio da reação de imunoadsorção enzimática, na qual as placas de ELISA sensibilizadas com as proteínas recombinantes (KMP-11, H2A, HSP83, HSP70, LiP0, LiP2a e LiP2b) e o antígeno total de *L. infantum* (SLA) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Manuel Soto (Departamento de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidade Autónoma de Madrid). A clonagem, expressão e purificação destas proteínas foi realizada segundo o protocolo descrito por Soto et al. (2015) e a determinação da concentração das proteínas foi realizada pelo Método de Bradford (1976). A técnica de ELISA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular (Inbio/UFMS), utilizando antígenos recombinantes de *L. infantum* em placas de 96 poços de poliestireno de superfície MaxiSorp™ (NUNC/ Thermo Scientific), que foram previamente sensibilizadas com os antígenos proteicos na concentração de 2µg/mL para antígeno total de *L. infantum* (SLA) e 1µg/mL para os demais antígenos recombinantes (LiP2a, LiP2b, LiP0, HSP70, HSP83, KMP-11 e H2A) diluídos em tampão Ureia 3M pH 8, e incubadas *overnight* à 4°C. Após a incubação o conteúdo das placas foi desprezado e estas lavadas por três vezes com 200 µL por poço de Wash Buffer – PBS-TB (PBS + 0,5% Tween 20). Em seguida foi realizado o bloqueio dos poços com 200 µL por poço de Blocking Buffer - BB (PBS-TB com 5% de leite desnatado) e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Após o bloqueio as placas foram lavadas quatro vezes com 200 µL de PBS-TB (PBS + 0,5% Tween 20) por poço. A diluição dos soros caninos utilizados foi de 1:400 em BB (PBS-TB com 5% de leite desnatado), logo após adicionado 100 µL em cada poço e incubados por 2h. Seguiram-se novamente etapas de lavagem descritas anteriormente. Realizou-se nova incubação com o conjugado anti-cão marcado com peroxidase (SIGMA Nº Cat: A6792), durante 1h, numa diluição de 1:6000 em BB (PBS-TB com 5% de leite desnatado). Seguiram-se novamente etapas de lavagem. Para revelação das reações foram utilizadas primeiramente

cápsulas de tampão citrato-fosfato com perborato de sódio (PCB) (SIGMA N° Cat: P4922) diluídas em água destilada (uma capsula para 100 mL de água destilada), acrescentou-se depois duas pastilhas de OPD 20 mg (o-phenylenediamine dihydrochloride) (Sigma Chemical Company – P7288), e por fim adicionando-se 200 µL por poço, após 20 min. em câmara escura a reação foi interrompida com solução de parada (H₂SO₄ 3N) com 50 µL por poço (adaptado de SOTO et al., 2015). A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm, utilizando o aparelho Spectra Max 190.

Análise estatística:

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA). Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste de ANOVA, seguido do teste de Kruskal Wallis para comparação múltipla de médias adquiridas a partir da densidade ótica-DO dos soros de cada grupo com pós teste de Mann-Whitney, com nível de significância de $p < 0,05$ e IC- 95%. O ponto de corte de cada antígeno foi estabelecido utilizando a curva ROC, baseado na maior sensibilidade e especificidade, em que o desempenho e acurácia de cada teste foram estabelecidos a partir da área sob a curva – ASC.

Resultados e discussão

Nos últimos anos, os avanços tecnológicos permitiram a identificação de diversas proteínas antigênicas de *L. infantum* para utilização no ELISA, no entanto poucas foram colocadas em prática para avaliação (BARBOSA et al., 2012). A busca por antígenos recombinantes com grau de pureza maior visa aumentar a especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade do ELISA (PASSOS et al., 2005). Este trabalho permitiu a análise do desempenho das proteínas recombinantes de *L. infantum* (LiP2a, LiP2b, LiP0, HSP70, HSP83, KMP-11 e H2A) e do antígeno solúvel do parasita aplicados no diagnóstico da LVC em grupos com parâmetros clínicos definidos e diferenciados. Os valores de sensibilidade, especificidade e razão de verossimilhança (*likelihood ratio*) dos antígenos estudados foram obtidos ao testá-los com soros de cães naturalmente infectados (cães

assintomáticos e sintomáticos) e negativos para LVC (cães negativos, vacinados e negativos com outras hemoparasitoses) (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação do desempenho de diferentes proteínas testadas com soros de cães negativos (n=102) e cães naturalmente infectados por *L. infantum* (n=90) de Mato Grosso do Sul, 2015 a 2016, n= 192.

Antígenos	Sensibilidade %	Especificidade %	Likelihood ratio
H2A	61,11	43,14	1,07
HSP83	70,00	43,14	1,23
LiP0	71,11	44,12	1,27
LiP2a	73,33	44,12	1,31
KMP-11	76,67	43,14	1,35
HSP70	77,78	43,14	1,37
SLA	72,22	50,98	1,47
LiP2b	70,00	52,94	1,49

Os valores de sensibilidade observados para as proteínas recombinantes utilizadas neste estudo são inferiores aos valores relatados em outros estudos realizados na Espanha (Tabela 2), os quais avaliaram apenas soros de cães sabidamente positivos para LVC. Entretanto, o uso de animais com diferentes perfis clínicos para a avaliação da sensibilidade e especificidade de um antígeno é de extrema importância para o julgamento da eficácia do mesmo, visto que representa com maior veracidade a população avaliada durante os inquéritos epidemiológicos sorológicos caninos.

Tabela 2. Sensibilidade das proteínas recombinantes testadas em amostras de Mato Grosso do Sul/Brasil e da Espanha, em diferentes períodos (dados bibliográficos).

Antígenos	Mato Grosso do Sul	Espanha
	Sensibilidade (%)	Sensibilidade (%)
H2A	61,11	78 (SOTO et al., 1995c)
HSP83	70,00	90 (ANGEL et al., 1996)
LiP0	71,11	78 (SOTO et al., 1995b)
LiP2a	73,33	88 (SOTO et al., 1995a)
KMP-11	76,67	75,4-96 (BERBERICH et al., 1997; TODOLÍ et al., 2009)
HSP70	77,78	100 (QUIJADA et al., 1996)
LiP2b	70,00	100 (SOTO et al., 1995a)

Moura (2017) também avaliou as mesmas proteínas recombinantes de *L. infantum* em animais positivos para LVC sintomáticos e assintomáticos, animais negativos para LVC, animais negativos para LVC e positivos sorologicamente para erliquiose e animais vacinados contra LVC, todos provenientes de Teresina, Piauí, Brasil. Os valores de sensibilidade apresentados por esta autora (Tabela 3) são bastante discrepantes dos valores observados no presente estudo, o que ressalta a dificuldade em obter um antígeno que mantenha sensibilidade e especificidade elevadas quando utilizado em amostras provenientes de diferentes regiões do país, dificultando o desenvolvimento de um teste sorológico diagnóstico padronizado para uso nacional.

Tabela 3. Sensibilidade e especificidade das proteínas testadas com soros de cães negativos e cães naturalmente infectados por *L. infantum*, provenientes de Mato Grosso do Sul e dados do Piauí (MOURA, 2017).

Antígenos	Mato Grosso do Sul		Piauí (MOURA, 2017)	
	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
H2A	61,11	43,14	18,48	97,27
HSP83	70,00	43,14	7,61	98,18
LiP0	71,11	44,12	7,61	99,09
LiP2a	73,33	44,12	34,78	99,07
KMP-11	76,67	43,14	20,88	97,27
HSP70	77,78	43,14	5,44	99,09
SLA	72,22	50,98	9,78	99,09
LiP2b	70,00	52,94	9,78	99,09

Apesar de alguns autores apontarem baixa ou nenhuma variabilidade intraespecífica entre as cepas de *L. infantum* isoladas de cães provenientes de diferentes regiões do Brasil (COUTINHO et al., 2011; BATISTA et al., 2012; SILVA et al., 2015), já foi relatado que os genótipos de *Leishmania* segregam-se em *clusters* de acordo com a região geográfica de origem, demonstrando associação entre estes isolados e áreas geográficas específicas (OCHSENREITHER et al., 2006; SEGATTO et al., 2012). Estes fatos evidenciam a importância de avaliar potenciais antígenos para testes sorológicos diagnósticos de LVC em regiões distintas do país.

Ainda com relação aos resultados obtidos por Moura (2017), seus valores de especificidade (Tabela 3) são superiores aos descritos neste estudo; fato este que pode ser justificado pela utilização na presente pesquisa de um grupo amostral composto não apenas por animais portadores de erliquiose mas, formado também por animais infectados com *Babesia canis* e *Anaplasma platys*; hemoparasitas transmitidos pelo mesmo vetor de *Ehrlichia canis*, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (DANTAS-TORRES, 2008).

A sensibilidade e especificidade da reação de imunoadsorção enzimática podem variar também de acordo com o antígeno utilizado, seu grau de purificação e fatores laboratoriais como tempo de incubação ou tipo de microplacas utilizadas (REITHINGER et al., 2002; BOARINO et al., 2008; FARAHMAND & NAHREVANIAN, 2016). O kit ELISA (EIE-Bio-Manguinhos®) utilizado pelo Ministério da Saúde emprega antígeno solúvel de *Leishmania major-like*, o qual já foi relatado com sensibilidade variando de 72% a 100% e especificidade variando de 68% a 96% (LIRA et al., 2006; FERREIRA et al., 2007; ALVES et al., 2012). O potencial diagnóstico de antígenos totais de *Leishmania* sp. para detecção de animais sintomáticos já foi demonstrado (FERREIRA et al., 2007; PORROZZI et al., 2007; MORALES-YUSTE et al., 2012); porém sua sensibilidade se torna menor ao pesquisar anticorpos contra infecções mais recentes e assintomáticas (QUINNELL et al., 2001; REITHINGER et al., 2002; METTLER et al., 2005).

No presente estudo, o antígeno solúvel de *L. infantum* mostrou-se capaz de distinguir animais infectados dos negativos ($p < 0,0001$) (Figura 1A), todavia, não reconheceu 27,8% dos infectados (sintomáticos e assintomáticos) (Figura 1A e 2A). SLA apresentou a segunda maior razão de verossimilhança (1,49) e foi capaz de diferenciar cães sintomáticos de assintomáticos ($p < 0,05$) (Figura 2A). No entanto, esta proteína reagiu com animais negativos com hemoparasitas e vacinados (Figura 3A). Este fato pode ser explicado já que a utilização de antígenos totais acarreta redução da especificidade e reprodutibilidade da técnica sorológica (CARVALHO et al., 2002; RAMOS-JESUS et al., 2016) e ocorrência de reações cruzadas com soros de animais infectados com outros agentes (FERREIRA et al., 2007; MARCONDES et al., 2011; ZANETTE et al., 2013). O antígeno total apresenta proximidade antigênica com epítomos de outros agentes infecciosos e, dessa forma, pode reagir cruzadamente com anticorpos presentes em amostras sorológicas de pacientes portadores de outras infecções (MANCIANTI et al., 1996; METTLER et al., 2005; ZANETTE, 2006; FERREIRA et al., 2007). Por fim, a SLA também reagiu com o soro de animais negativos (50,5%) e não foi capaz de diferenciá-los de animais assintomáticos (Figura 3A). Este conjunto de fatores fundamenta a busca por novas proteínas antigênicas que visem melhorar a sensibilidade

e especificidade do ELISA, já que o uso de antígeno total possibilita a permanência de animais infectados no ambiente e ainda condena animais falsos-positivos à eutanásia.

Considerando a razão de verossimilhança das proteínas avaliadas, a LiP2b obteve o melhor resultado. Skeiky et al. (1994) e Requena et al. (2000) destacaram que as proteínas ácidas ribossomais apresentam elevada imunogenicidade em cães e humanos infectados com *L. infantum*, não havendo reatividade cruzada com *Trypanosoma cruzi*. Neste estudo, LiP2b foi capaz de identificar os animais infectados, no entanto não os diferenciou significativamente de cães negativos, havendo reação com os últimos (47,6%) (Figura 1B). Além disto, esta proteína recombinante não possibilitou a diferenciação entre cães assintomáticos, sintomáticos e negativos (Figura 2B) e na análise discriminada de cada grupo foi observada reatividade com animais negativos e negativos portadores de hemoparasitas e diferenciação apenas dos animais vacinados dos demais grupos ($p < 0,05$), com exceção do grupo negativos (Figura 3B).

Outra proteína ribossomal, a LiP0, que não apresenta reação cruzada com os determinantes antigênicos de LiP2, foi testada e foi capaz de diferenciar animais infectados dos negativos ($p < 0,001$) (Figura 1C). Porém, reagiu com amostras de animais negativos (55,3%) para LVC (Figura 1C) e não diferenciou os mesmos de assintomáticos (Figura 2C). Ademais, a análise entre cada grupo foi capaz de diferenciar apenas os animais sintomáticos dos animais negativos ($p < 0,001$) e reagiu com animais negativos e negativos com hemoparasitas (Figura 3C).

Já a proteína LiP2a desencadeou resposta imune diferente de LiP2b e LiP0 tanto nos estudos de Soto et al. (1995a) quanto no presente estudo. Esta proteína demonstrou maior sensibilidade e alta reatividade com os animais infectados, sendo capaz de diferenciá-los significativamente dos animais negativos ($p < 0,0001$) (Figura 1D). Entretanto, LiP2a reagiu de forma não esperada em alguns animais soronegativos (57,3%) (negativos, vacinados e negativos com hemoparasitoses), falhando em realizar a distinção entre estes e os assintomáticos (Figura 2D). Em contrapartida, dentre todas as proteínas antigênicas testadas, a LiP2a foi a única hábil em diferenciar todos os grupos analisados ($p < 0,05$) (sintomáticos, assintomáticos, negativos e negativos com hemoparasitas), com

exceção do grupo vacinado, das amostras do grupo negativo (Figura 3D), o que demonstrou seu potencial em proporcionar maior especificidade no diagnóstico da LVC.

As proteínas de choque térmico despertaram interesse como antígenos já que estão envolvidas na transição de hospedeiros do parasita, o qual é submetido a um estresse térmico ao migrar do inseto vetor para o hospedeiro mamífero (LATHIGRA et al., 1991). Dentre estas proteínas, a HSP70 e HSP83 mostraram-se antígenos imunodominantes durante a resposta promovida por diversos agentes patogênicos humanos como *Plasmodium falciparum* (BIANCO et al., 1986; JENDOUBI & BONNEFOY, 1988), *Trypanosoma cruzi* (DRAGON et al., 1987; ENGMAN et al., 1990) e *L. donovani* (MACFARLANE et al., 1990; ANDRADE et al., 1992). Neste contexto, Quijada et al. (1996) e Angel et al. (1996) investigaram a capacidade de HSP70 e HSP83, respectivamente, reagirem com soros de cães infectados com *L. infantum* e observaram potencial diagnóstico para estes antígenos. Corroborando com estes dados, em nosso estudo, ambas as proteínas foram eficientes em distinguir os animais infectados (sintomáticos e assintomáticos) pelo protozoário (Figuras 1E e 1F) e HSP70 apresentou a maior sensibilidade dentre todas as proteínas investigadas (Tabela 1). Contudo, ambas as proteínas recombinantes reagiram com 57,3% dos soros de animais negativos testados.

Apesar de apresentarem especificidades semelhantes, HSP70 foi capaz de diferenciar estatisticamente animais negativos de animais sintomáticos e assintomáticos ($p < 0,05$), diferentemente de HSP83 (Figuras 2E e 2F). Desta maneira, HSP70 pode ser uma ferramenta útil no diagnóstico de infecções iniciais assintomáticas, como já demonstrado por Nieto et al. (1999). Na análise comparativa entre grupos, HSP70 também teve melhor desempenho, falhando apenas em distinguir animais vacinados e negativos com hemoparasitas dos animais negativos, o que explica a reatividade do antígeno com o soro destes dois grupos (Figura 3E). Nesta mesma análise, HSP83 apenas diferenciou animais sintomáticos de animais negativos ($p < 0,05$) e apresentou reação com amostras de animais negativos com hemoparasitas (Figura 3F). Desta maneira, o potencial diagnóstico de ambas as proteínas de choque está comprometido devido à reatividade com soros de animais negativos (animais vacinados, negativos com

hemoparasitas e negativos), o que foi mais observado em HSP83. Esta última foi incapaz de distinguir cães infectados de negativos (Figura 1F) e apresentou razão de verossimilhança menor que SLA, discordando de Menezes-Souza et al. (2014) que demonstraram sua superioridade quando comparada ao antígeno total.

A proteína de membrana dos cinetoplastídeos de 11KDa (KMP-11) apresenta importante função imunoestimulatória de células B durante a infecção por *L. infantum*, induzindo a proliferação de linfócitos (BERBERICH et al., 1997; SOFLAEI et al., 2013). Logo, Berberich et al. (1997) e Todolí et al. (2009) verificaram a identificação desta proteína recombinante por anticorpos de animais com LVC. Nossos resultados também demonstraram a propriedade da KMP-11 em detectar animais infectados e diferenciar os mesmos de animais negativos ($p < 0,001$) (Figura 1G); no entanto, esta proteína reagiu com 57,3% dos animais deste último grupo. A proteína KMP-11 não foi capaz de diferenciar animais assintomáticos de negativos (Figura 2G), além de reagir com soros de animais vacinados, negativos com hemoparasitas e negativos (Figura 3G). Apenas os cães sintomáticos foram distinguidos dos demais grupos ($p < 0,05$), com exceção dos vacinados (Figura 3G), o que pode ser justificado pela relação desta proteína com a presença do parasita e o desenvolvimento da infecção, visto que sua expressão é maior em amastigotas (MATOS et al., 2010). Além disso, a KMP-11 parece estar relacionada ao estímulo da secreção de IL-10, citocina responsável pela persistência e multiplicação do parasita no interior dos macrófagos (CARVALHO et al., 2005); circunstância que aliada aos resultados apresentados justifica o potencial deste antígeno recombinante no diagnóstico de animais sintomáticos apenas.

Das quatro classes de histonas que compõem o nucleossomo de *L. infantum* (H2A, H2B, H3 e H4), H2A e H3 foram identificadas como as mais imunogênicas durante a infecção canina (SOTO et al., 1999). Desta maneira, Soto et al. (1995c) investigaram o potencial de H2A em reagir com soro de cães infectados com *L. infantum* e indicaram este antígeno como um potencial alvo durante a resposta imune humoral de cães com LVC, apesar de terem observado reação cruzada com histonas H2A de *T. cruzi*. Contudo, nossos resultados não demonstraram boa eficiência da H2A, visto que esta proteína não

foi hábil em diferenciar significativamente nenhum dos grupos avaliados (Figuras 1H, 2H e 3H), sendo assim inadequada para o diagnóstico, ao contrário de Nieto et al. (1999) que acreditavam que os anticorpos anti-histonas estavam relacionados a progressão da doença.

Dentre as proteínas recombinantes testadas, HSP70 e LiP2a foram as melhores em diferenciar significativamente os animais infectados (sintomáticos e assintomáticos) dos negativos (vacinados, negativos com hemoparasitas e negativos) ($p < 0,001$) e foram as únicas capazes de distinguir este último grupo de animais assintomáticos ($p < 0,05$). Faria et al. (2015) demonstraram que a associação de epítomos antigênicos pode ser uma ferramenta valiosa na produção de um ELISA mais sensível e específico aplicável a animais com diferentes apresentações clínicas.

Foi observado diferença significativa entre as amostras de cães infectados provenientes de Campo Grande e Camapuã apenas com a utilização do antígeno bruto de *L. infantum* (SLA) e as proteínas recombinantes HSP70 e HSP83 ($p < 0,001$) (Figuras 4A, 4E e 4F). Camapuã e Campo Grande são duas regiões epidemiologicamente distintas quanto a distribuição dos casos de LVA e LVC em Mato Grosso do Sul. A primeira é classificada como área de transmissão esporádica visto que registrou média de casos de LVA de 0,3 casos entre 2014 e 2016 e seu último inquérito sorológico canino, realizado em 2015, revelou prevalência de 13,54% para LVC (BORGES, 2017; MATO GROSSO DO SUL, 2017). Já a capital, apresentou média de 73,7 casos de LVA no mesmo período e o último inquérito sorológico canino, realizado no ano de 2012, demonstrou prevalência de 22,37% para a enfermidade canina (PMCG, 2012; MATO GROSSO DO SUL, 2017).

Frente a estas particularidades, é possível supor que a diferença observada entre as amostras de regiões distintas se deva à recente acomodação do parasita ao hospedeiro no município de Camapuã, visto que a região registrou seu primeiro caso de LVA em 2007, enquanto Campo Grande já registrava epidemias urbanas de LVA seis anos antes (FURLAN, 2010; BRASIL, 2017). Além disso, vetores distintos de *L. infantum*, *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia longipalpis*, são encontrados nos municípios de Camapuã e Campo Grande, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2017a,b;

FERNANDES et al., 2017). Estes fatores podem implicar variabilidade intraespecífica na cepa de *Leishmania infantum* envolvida na infecção, bem como respostas imunes e manifestações clínicas dissemelhantes nos hospedeiros de cada região (FALQUETO et al., 2003; SCHRIEFER et al., 2005).

Conclusão

Os antígenos LiP2a e HSP70 mostraram-se promissores na identificação de animais sintomáticos e assintomáticos para LVC e, portanto, sugere-se que sejam investigados de forma combinada no ELISA, com o intuito de obter um teste confirmatório de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade superior ao SLA, justificando a substituição do mesmo. Além disso, faz-se necessário estudos relacionados às possíveis diferenças intraespecíficas entre as cepas de *L. infantum* envolvidas nestas duas regiões.

Agradecimentos

Agradecemos aos professores Dr. Marcos Rogério André do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista – campus de Jaboticabal e Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos, do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEZ) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pelo fornecimento dos controles positivos para as reações em cadeia da polimerase. Agradecemos ao Prof. Dr. Manuel Soto (Departamento de Biologia Molecular Severo Ochoa, Universidade Autônoma de Madrid) pelo fornecimento das placas de ELISA sensibilizadas. Agradecemos ao apoio financeiro do CNPq nesta pesquisa (Cnpq/MS/SCTIE/DECIT N°32/201).

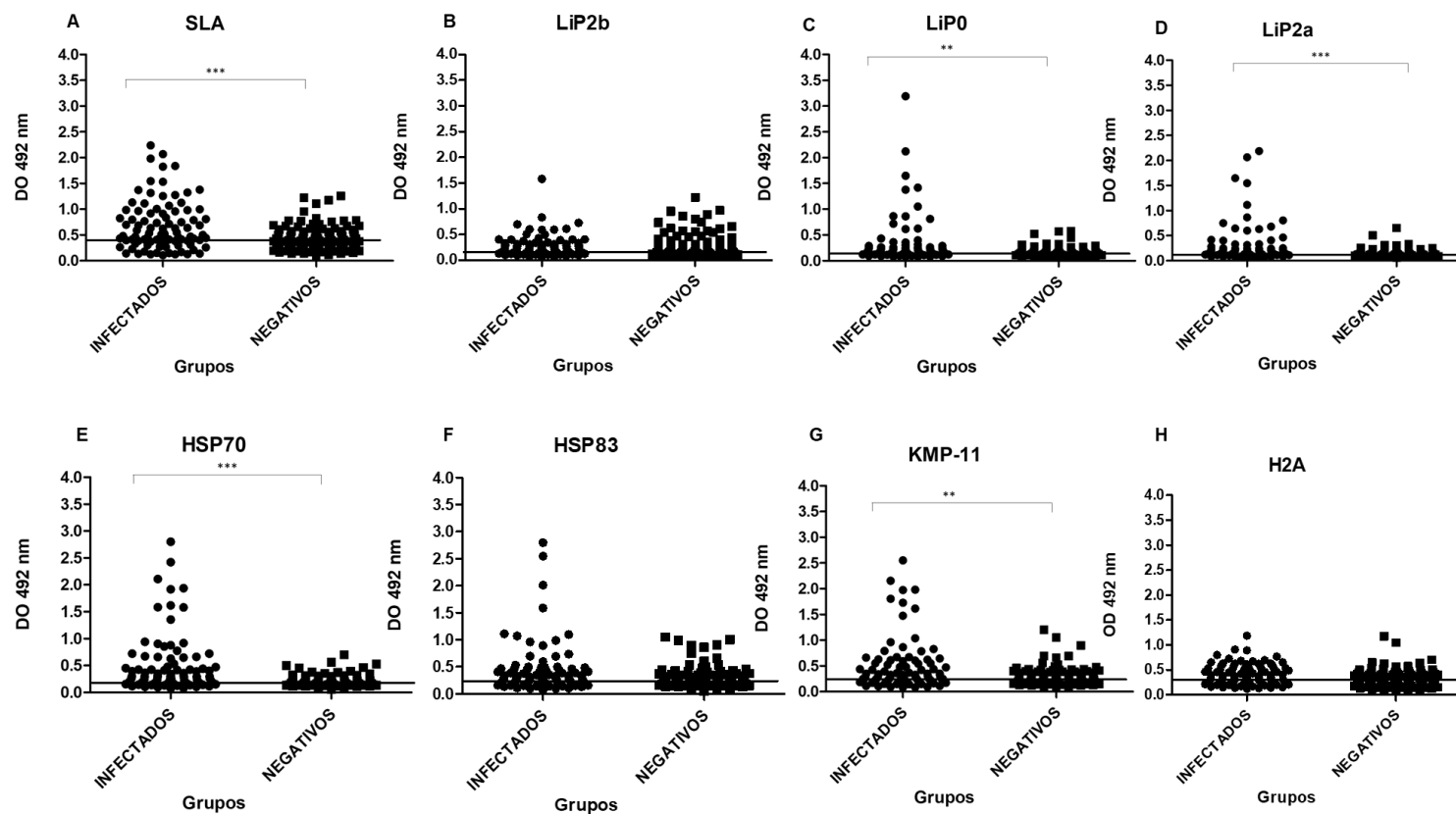


Figura 1. Anticorpos IgG em soros caninos. Nível de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. (cães assintomáticos e sintomáticos) e negativos (cães vacinados, negativos para LVC com hemoparasitose e negativos para LVC) testados com diferentes antígenos proteicos SLA (A), LiP2b (B), LiP0 (C), LiP2a (D), HSP70 (E), HSP83 (F), KMP-11 (G) e H2A (H), Mato Grosso do Sul, 2015 a 2016, n=192. O *cut-off* foi calculado a partir dos valores negativos e positivos da média das OD de cada amostra. Os pontos nos gráficos representam a média das densidades ópticas (DO) de cada amostra. A análise foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

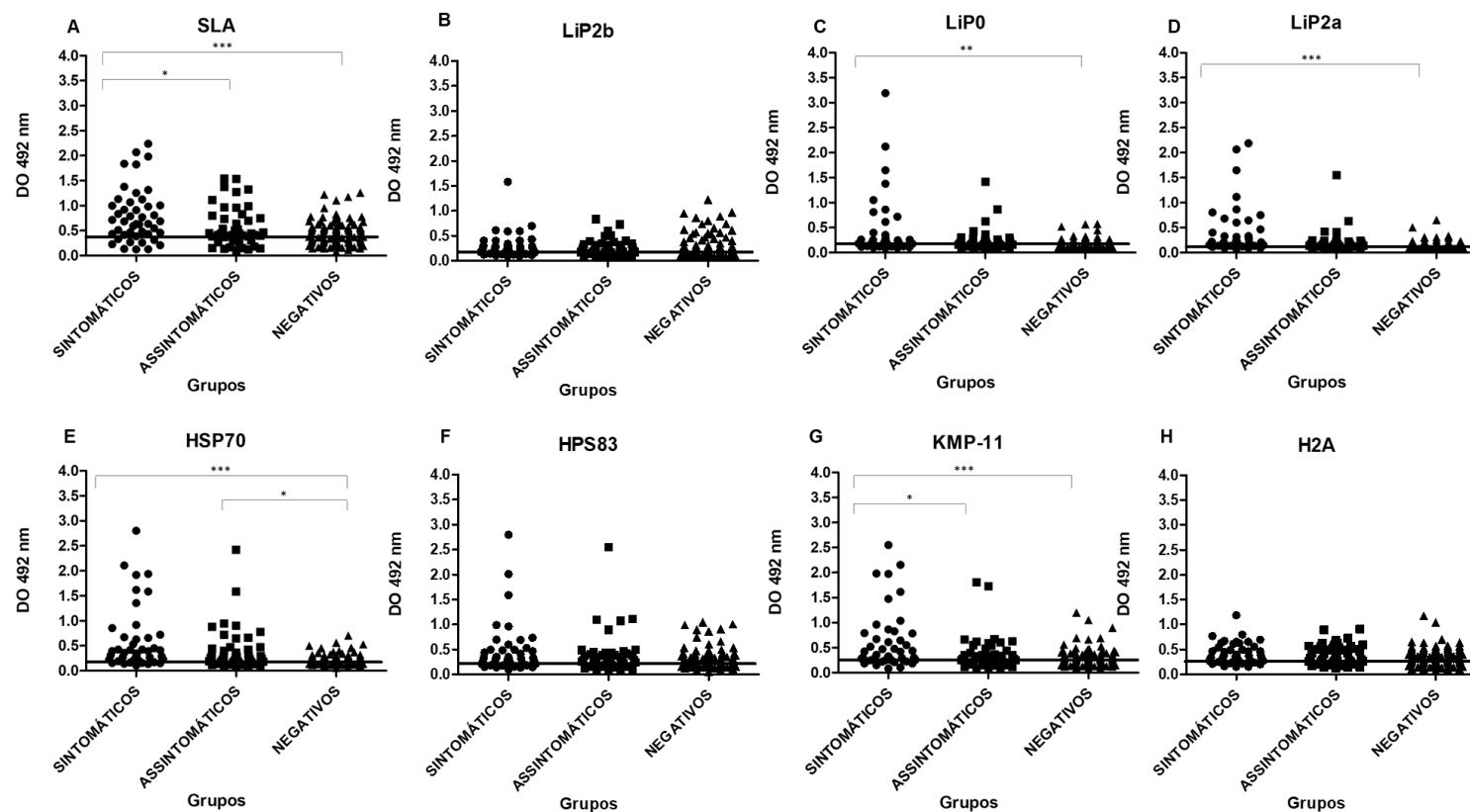


Figura 2. Anticorpos IgG em soros caninos. Nível de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. sintomáticos e assintomáticos e cães negativos (animais vacinados, negativos para LVC com hemoparasitose e negativos para LVC) testados com diferentes antígenos proteicos SLA (A), LiP2b (B), LiP0 (C), LiP2a (D), HSP70 (E), HSP83 (F), KMP-11 (G) e H2A (H), Mato Grosso do Sul, 2015 a 2016, n=192. O *cut-off* foi calculado a partir dos valores negativos e positivos da média das OD de cada amostra. Os pontos nos gráficos representam a média das densidades ópticas (DO) de cada amostra. A análise foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Mann-Whitney. *p<0,05, **p<0,001, ***p<0,0001.

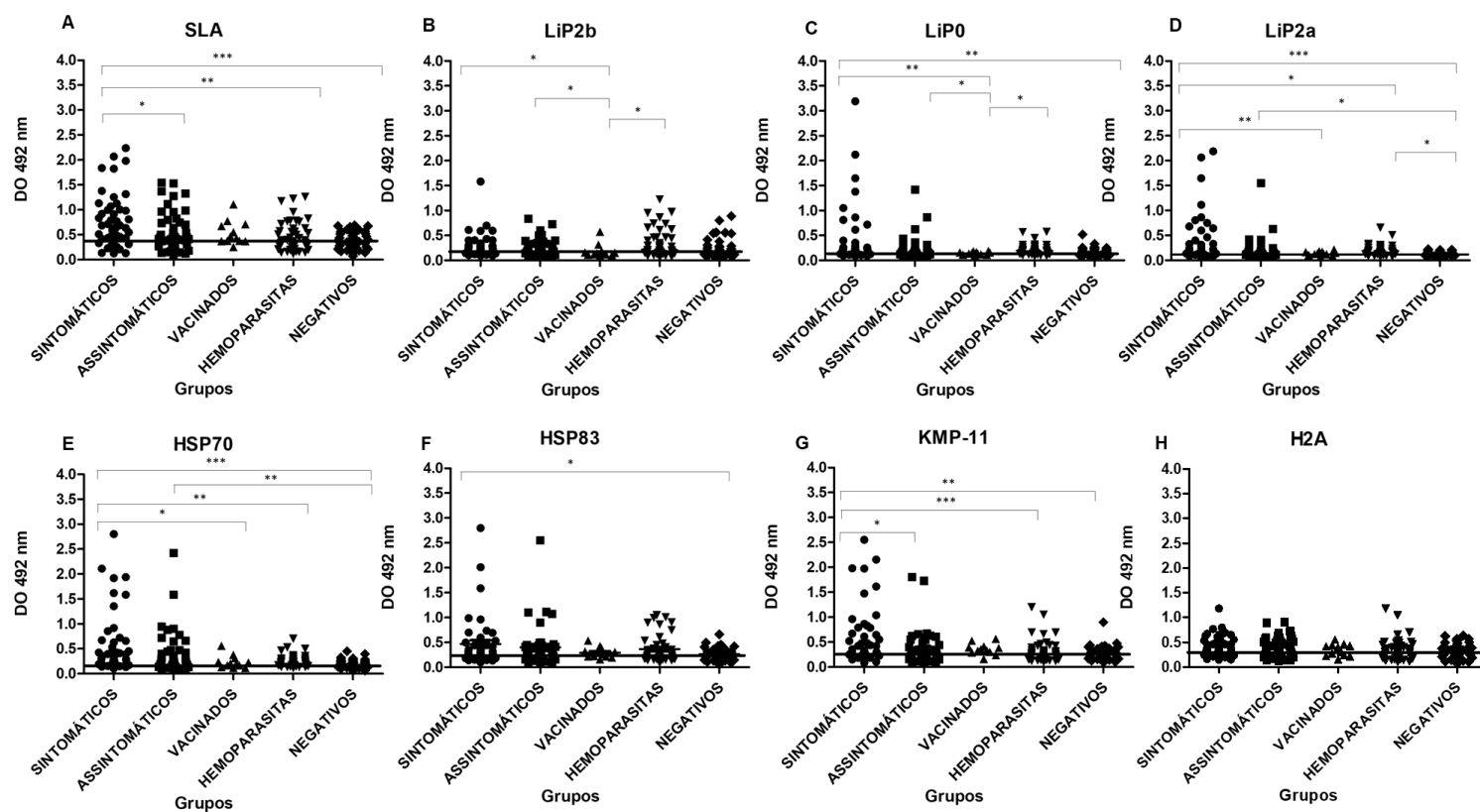


Figura 3. Anticorpos IgG em soros caninos. Nível de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. sintomáticos e assintomáticos, cães vacinados, cães negativos para LVC com hemoparasitose e cães negativos para LVC testados com diferentes antígenos proteicos SLA (A), LiP2b (B), LiP0 (C), LiP2a (D), HSP70 (E), HSP83 (F), KMP-11 (G) e H2A (H), Mato Grosso do Sul, 2015 a 2016, n=192. O *cut-off* foi calculado a partir dos valores negativos e positivos da média das OD de cada amostra. Os pontos nos gráficos representam a média das densidades ópticas (DO) de cada amostra. A análise foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Mann-Whitney. *p<0,05, **p<0,001, ***p<0,0001.

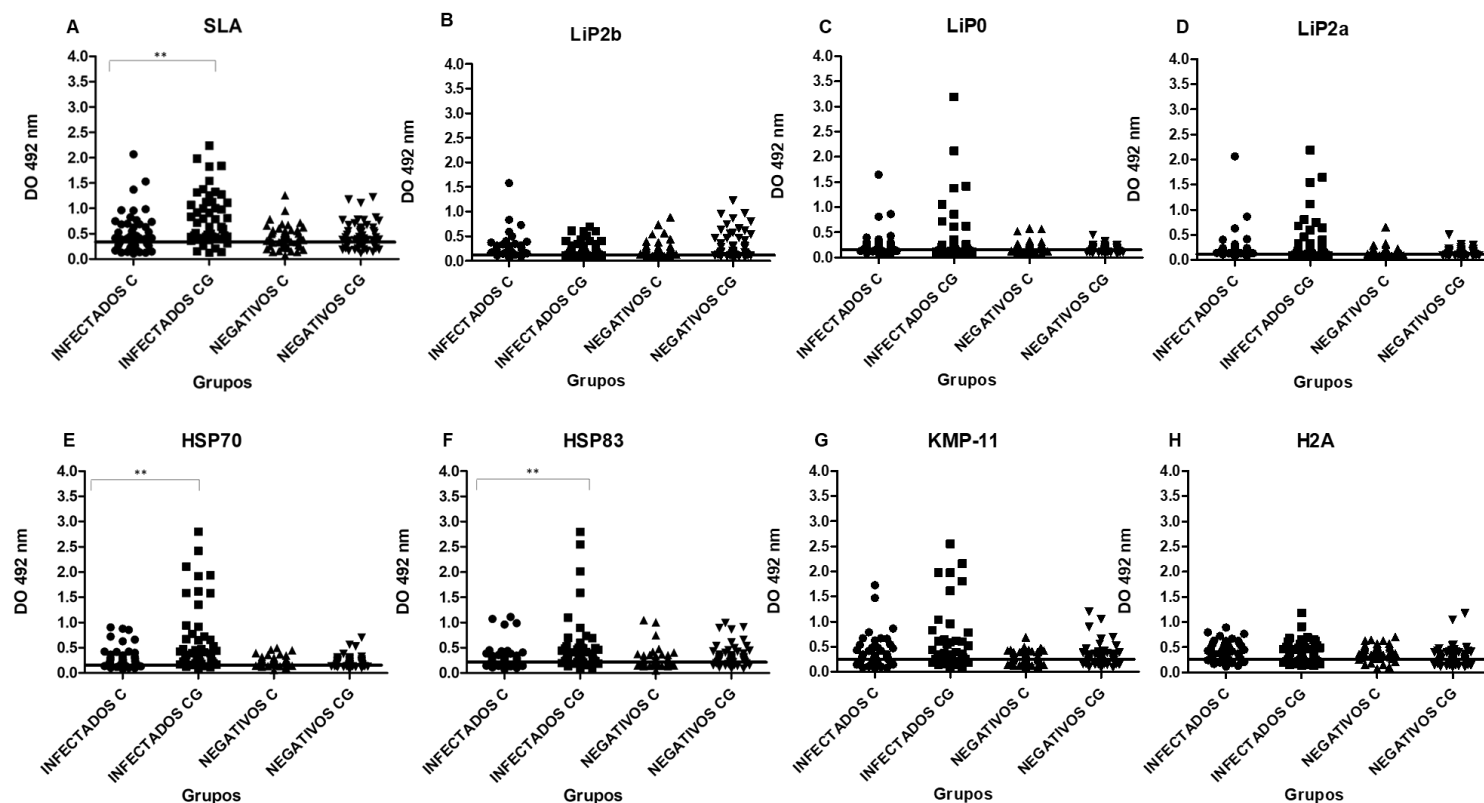


Figura 4. Anticorpos IgG em soros caninos. Comparação entre o nível de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. (cães assintomáticos e sintomáticos) provenientes de Camapuã (C, n=42) e Campo Grande (CG, n=48) e negativos (cães vacinados, negativos para LVC com hemoparasitose e negativos para LVC), provenientes de Camapuã (C, n=46) e Campo Grande (CG, n=56), testados com diferentes antígenos proteicos SLA (A), LiP2b (B), LiP0 (C), LiP2a (D), HSP70 (E), HSP83 (F), KMP-11 (G) e H2A (H), Mato Grosso do Sul, 2015 a 2016. O *cut-off* foi calculado a partir dos valores negativos e positivos da média das OD de cada amostra. Os pontos nos gráficos representam a média das densidades ópticas (DO) de cada amostra. A análise foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Referências

- 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):356-371.
- Alves AS, Mouta-Confort E, Figueiredo FB, Oliveira RVC, Schubach AO, Madeira MF. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Res Vet Sci* 2012; 93(3):1329-1333.
- Andrade CR, Kirchhoff LV, Donelson JE, Otsu, K. Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. *J Clin Microbiol* 1992; 30(2):330-335.
- Angel SO, Requena JM, Soto M, Criado D, Alonso C. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. *Acta Trop* 1996; 62(1):45-56.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000; 30(12):1269-1281.
- Barbosa EB, Vidotto A, Polachinni GM, Henrique T, Marqui ABT, Tajara EH. Proteômica: Metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Ver Ass Med Bras* 2012; 58(3):355-375.
- Batista LFS, Segatto M, Guedes CES, Sousa RS, Rodrigues CAT, Brazuna JCM et al. An assessment of the genetic diversity of *Leishmania infantum* isolates from infected dogs in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86(5):799-806.
- Berberich CR, Requena JM, Alonso C. Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Exp Parasitol* 1997; 85(1):105-108.
- Bianco AE, Favaloro JM, Burkot TR, Culvenor JG, Crewther PE, Brown GV. A repetitive antigen of *Plasmodium falciparum* that is homologous to heat shock protein 70 of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83(2):8713-8717.
- Boarino A, Bollo E, Prunotto L, Canale L, Uslenghi F, Poletti P. Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Comp Immunol Microbiol Infec Dis* 2008; 31(6):527-536.
- Borges LM. *Aspectos zoonóticos da leishmaniose visceral em Camapuã, MS*. [Dissertação]. Mato Grosso do Sul: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul; 2017.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72(2):248-54.

Brasil, Ministério da Saúde. Nota Técnica Conjunta nº 01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. *Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC)*. (Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública). Brasília. Ministério da Saúde, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Sistema de Informação de Agravos de Notificação*. Leishmaniose visceral: casos confirmados e notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação: Mato Grosso do Sul. Acesso em janeiro de 2017. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvMS.def>>

Carret C, Walas F, Carcy B, Grande N, Précigout E, Moubri K et al. *Babesia canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *J Eukaryot Microbiol* 1999; 46(3):298-303.

Carvalho FAA, Charest H, Tavares CAP, Matlashewski G, Valente EP, Rabello A. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43(4):289-295.

Carvalho LP, Passos S, Dutra WO, Soto M, Alonso C, Gollob KJ et al. Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scand J Immunol* 2005; 61(4):337-342.

Coutinho CER, Santos DO, BAPTISTA, C.; FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. F. Evaluation of *Leishmania (Leishmania) chagasi* strains isolated from dogs originating from two visceral leishmaniasis-endemic areas in Brazil using multilocus enzyme electrophoresis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44(5): 572-575.

Da Costa-Val AP, Cavalcanti RR, Gontijo FN, Michalick MS, Alexander B, Williams P et al. Canine visceral leishmaniasis relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia longipalpis* infectivity. *Vet J* 2007; 174(4):636-643.

D'agnone AS. *Caracterização molecular de espécies da família anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal-SP e de Campo Grande-MS*. [Tese]. São Paulo: “Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”; 2006.

Dantas-Torres F. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit Vectors* 2008; 1:25. doi:10.1186/1756-3305-1-25.

Dawson JE, Stallknecht DE, Howerth EW, Warner C, Biggie K, Davidson WR et al. Susceptibility of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) to Infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the Etiologic Agent of Human Ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32(11):2725-2728.

Dawson JE, Warner CK, Standaert S, Olson J G. The interface between research and the diagnosis of an emerging tick-borne disease, human ehrlichiosis due to *Ehrlichia chaffeensis*. *Arch Intern Med* 1996; 156(2):137-142.

Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica do calazar, no Ceará. *O Hospital* 1955; 48:61-76.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27(5):305-318.

Dragon EA, Sias SR, Kato EA, Gabe JD. The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. *Mol Cel Bio* 1987; 7(3):1271-1275.

Engman DM, Dragon EA, Donelson JE. Human humoral immunity to hsp70 during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 1990; 144(10):3987-3991.

Falqueto A, Sessa PA, Ferreira A, Vieira VP, Santos CB, Varejao JB et al. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98(8):1003-1010.

Farahmand M, Nahrevanian H. Application of recombinant Proteins for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in humans and dogs. *Iran Biomed J* 2016; 20(3):128-134.

Faria AR, Veloso LC, Coura-Vital, Wendel, Reis AB, Damasceno LM et al. Novel recombinant multiepitope proteins for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania infantum* infected Dogs. *PloS Negl Trop Dis* 2015; 9(1):3429.

Fernandes WS, Borges LM, Casaril AE, Oliveira EF, Infran JOM, Piranda EM et al. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in na urban area, Central-West of Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2017; 59:e54. doi: 10.1590/S1678-9946201759054.

Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* 2007; 146(3-4):235-241.

Ferreira SA, Ituassu LT, Melo MN, Andrade ASR. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 2008; 152(3-4):257-263.

Fonseca AM, Faria AR, Rodrigues FTG, Nagem RAP, Magalhães, RDM, Cunha JL et al. Evaluation of three recombinant *Leishmania infantum* antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Trop* 2014; 137:25-30. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.04.028.

Furlan MBG. Epidemia de leishmaniose visceral no município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. *Epidemiol e Serv Saúde* 2010; 19(1):15–24.

Gomes YM, Cavalcanti MP, Lira RA, Abath FGC, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *Vet J* 2008; 175(1):45-52.

Gontijo CMF, Melo M N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, Desafios e Perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2004; 7(3):338-349.

Greer CE, Peterson SL, Nancy HT, Kivia TB, Manos MM. PCR amplifications from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol* 1991; 95(2):117-124.

Grimaldi JR, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993; 361(3):.230-250.

Inokuma HH, Fujii K, Matsumoto K, Okuda M, Nakagome K, Kosugi R et al. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. *Vet Parasitol* 2002; 110(1-2):145-152.

Jendoubi M, Bonnefoy S. Identification of a heat shock-like antigen in *P. falciparum*, related to the heat shock protein 90 family. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(22):109-128.

Lathigra RB, Butcher PD, Garbe TR, Young DB. Heat shock proteins as virulence factor of pathogens. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991; 167:125-143.

Laurenti MD, Junior MVSL, Tomokane TY, De Lucca HLR, Aschar M, Souza CSF, 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.

Lira RA, Cavalcanti MA, Nakazawa M, Ferreira AGP, Silva ED, Abath FGC, et al. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet Parasitol* 2006; 137(1-2):11-16.

Macfarlane J, Blaxter ML, Bishop RP, Miles MA, Kelly JM. Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. *Eur J Biochem* 1990; 190(2):377-384.

Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna E A. Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios. *Cad Saúde Pública* 2008; 24(12):2941-2947.

Magalhães-Junior JT, Mota TF, Porfirio-Passos G, Laranjeira DF, Franke CR.; Barrouin-Melo SM. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. *Vet Parasitol* 2016; 223:120-6. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.04.031.

Mancianti F, Pedonese F, Poli A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescent assay. *Vet Parasitol* 1996; 65(1-2):1-9.

Marcondes M, Biondo AW, Gomes AAD, Silva ARS, Vieira RFC, Camacho AA et al. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Vet Parasitol* 2011; 175(1-2):15-19.

Mato Grosso do Sul. Secretaria de Estado de Saúde. Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica. Gerência Estadual de Zoonoses. *Informe epidemiológico das leishmanioses* nº 5/2017. 2017.

Matos DC, Faccioli LA, Cysne-Finkelstein L, Luca PM, Corte-Real S, Armôa GR et al. Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(3):341-347.

Menezes-Souza D, Mendes TA, Gomes MS, Reis-Cunha JL, Nagem RA, Carneiro CM et al. Epitope mapping of the HSP83.1 protein of *Leishmania braziliensis* discloses novel targets for immunodiagnosis of tegumentary and visceral clinical forms of leishmaniasis. *Clin Vacc Immunol* 2014; 21(7):949-959.

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(11):5515-5519.

Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88(4):491-493.

Morales-Yuste M, Morillas-márquez F, Díaz-sáez V, Barón-López S, Acedo-Sánchez C, Martín-Sánchez J. Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios. *Parasitol Res* 2012; 111(1):155-64.

Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 2002; 18(9):399-405.

Moura LD. *Proteínas recombinantes e seu uso no diagnóstico de leishmaniose visceral canina*. 57 f. [Dissertação]. Mestrado em Ciência Animal – Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2017.

Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, et al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 67(2):117-130.

Nunes CM, De Lima VMF, De Melo GD, De Paula HB, Pereira MEG, Tronco CMT, et al. Serological, parasitological and molecular tests for canine visceral leishmaniasis diagnosis in a longitudinal study. *Rev Bras Parasitol Vet* 2015; 24(4):402-409.

Ochsenreither S, Kuhls K, Schaar M, Preseber W, Schonian G. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *J Clin Microbiol* 2006; 44(2):495-503.

Oliveira AG, Galati EAB, Oliveira O, Oliveira GRO, Espindola AR, Dorval MEC, et al. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(8): 869-874.

Oliveira GGS, Magalhães FB, Teixeira MAC, Pereira AM, Pinheiro CGM, Santos LR, et al. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinctive capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 85(6):1025-1034.

Oliveira EF, Oshiro ET, Fernandes WS, Ferreira AMT, Oliveira AG, Galati EAB. Vector competence of *Lutzomyia cruzi* naturally demonstrated for *Leishmania infantum* and suspected for *Leishmania amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg* 2017a; 96(1):178-181.

Oliveira EF, Oshiro ET, Fernandes WS, Murta PG, Medeiros MJ, Souza, AI, et al. Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. *Plos Negl Trop Dis* 2017b;11(2), e0005401. doi:10.1371/journal.pntd.0005401.

Paranhos-Silva M, Freitas LAR, Santos WC, Grimaldi Jr-G, Pontes-De-Carvalho LC, Oliveira-Dos-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55(1):39-44.

Passos S, Carvalho LP, Orge G, Jerônimo SM, Bezerra, G, Soto, M, et al. Recombinant *Leishmania* antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12(10):1164-1167.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernardina W, Del Real G, Ruitenberg J. Cellular and immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 1994; 62(1):229-235.

Peixoto, HM, Oliveira, MRF, Romero, GAS. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systemic review and meta-analysis. *Trop Med Int Health* 2015; 20(3):334-352.

Porrozzi 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.

Prefeitura Municipal de Campo Grande. Secretaria Municipal de Saúde Pública. Diretoria de vigilância em saúde. Coordenadoria de Controle em Zoonoses. Serviço de Controle de Raiva e outras Zoonoses. *Relatório anual*. Campo Grande, MS, 2012.

Quijada L, Requena JM, Soto M, Alonso C. During canine viscero-cutaneous leishmaniasis the anti-Hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. *Parasitology* 1996; 112(3):277-284.

Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, et al. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, sorology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitol* 2001; 122(3):253-261.

Ramos-Jesus J, Pontes-De-Carvalho LC, Melo SMB, Alcântara-Neves NM, Dutra RF. A gold nanoparticle piezoelectric immunosensor using a recombinant antigen for detecting *Leishmania infantum* antibodies in canine serum. *Biochem Eng J* 2016; 110:43-50. doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.027

Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander, B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40(7):2352-2356.

Requena JM, Alonso C, Soto M. Evolutionary conserved proteins and prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today* 2000; 16(6):246-250.

Schriefer ALF, Sousa RS, Guimarães LH, Goés-Neto A, Schriefer A. Papel do parasita e do hospedeiro na expressão clínica das leishmanioses. *GM Bahia* 2005; 75(1):46-56.

Segatto M, Ribeiro LS, Costa DL, Costa CHN, Oliveira MR, Carvalho SFG, et al. Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107(1):39-47.

Silva TAM, Gomes LI, Oliveira E, Coura-Vital W, Silva LA, Pais FS, et al. Genetic homogeneity among *Leishmania (Leishmania) infantum* isolated from dog and human samples in Belo Horizonte Metropolitan Area (BHMA), Minas Gerais, Brazil. *Parasit Vectors* 2015; 8:226. doi: 10.1186/s13071-015-0837-y.

Silva KR, Mendonça VRR, Silva KM, Nascimento LFM, Mendes-Sousa AF, de Pinho FA, et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endêmica area in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2017; 112(1):53-62.

Skeiky YA, Benson DR, Elwasila M, Badaro R, Burns JrJM, Reed SG. Antigens shared by *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*: immunological comparison of the acidic ribosomal P0 proteins. *Infect Immun* 1994; 62(5): 1643-1651.

Soares MRA, Mendonça IL, Bonfim JM, Rodrigues JA, Werneck GL, Costa CHN. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Trop* 2011;117(1):6-9.

Soflaei S, Dalimi A, Ghafarifar F. Molecular cloning and expression of the *Leishmania infantum* KMP-11 gene. *Jundishapur J Microbiol* 2013; 6(2):132-137.

Soto M, Requena JM, Quijada L, Angel SO, Gomez LC, Guzman F. During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. *J Clin Exp Immunol* 1995a; 100(2):246-252.

Soto M, Requena JM, Quijada L, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C. Identification of the *Leishmania infantum* P0 ribosomal protein epitope in canine visceral leishmaniasis. *Immunol Lett* 1995b; 48(1):23-28.

Soto M, Requena JM, Quijada L, Garcia M, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett* 1995c; 48(3), p.209-214.

Soto M, Requena JM, Quijada L, Perez MJ, Nieto CG, Guzman F, et al. Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *J Clin Exp Immunol* 1999; 115(2):342-349.

Soto M, Corvo L, Garde E, Ramírez L, Iniesta V, Bonay P, et al. Co-administration of the three antigenic *Leishmania infantum* poly (A) binding proteins as a DNA vaccine induces protection against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Plos Negl Trop Dis* 2015; 9(5):1-24.

Todoí F, Pérez-Filgueira M, Galindo I, Gómez-Sebastián S, Escribano JM, Rodríguez-Cortés A, et al. Seroreactivity against raw insect-derived recombinant KMPII, TRYP, and LACK *Leishmania infantum* proteins in infected dogs. *Vet Parasitol* 2009; 164(2-4):154-161.

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.

Verçosa BLA, Lemos CM, Mendonça IL, Silva SMMS, 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):1-7.

Waner CK, Dawson JE. Genus and Species-level identification of *Ehrlichia* species by PCR and sequencing. In: PERSING, D. H (Ed.). *PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases. A supplement to Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. ASM Press. Washington, 1996, p. 100- 105.

Werneck GL. The control of visceral leishmaniasis in Brazil: end of a cycle? *Cad. Saúde Pública* 2016; 32(6), eED010616.

World Health Organization. *Disease Watch Focus: Leishmaniasis*. 2007 In: TDR | Nature Reviews Microbiology. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/disease_watch/leish/en/>. Acesso em 20 de maio de 2016.

Zanette MF. *Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina*. [Dissertação]. Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Curso de Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, 2006.

Zanette MF, De Lima VM, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RFC, 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* 2013; 47(1): 105-107.

6. ARTIGO 2

Manifestações clínicas e resposta ao TR-DPP® de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* em áreas de transmissão intensa e esporádica de leishmaniose visceral

Clinical manifestations and response to TR-DPP® of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* in areas of intense and sporadic transmission of visceral leishmaniasis

Nathália Lopes Fontoura Mateus¹, Leandro Machado Borges², Everton Falcão de Oliveira³, Elisa Teruya Oshiro⁴, Jucelei de Oliveira Moura Infran⁴, Paulo Eduardo de Oliveira Monteiro⁵, Carlos Eurico dos Santos Fernandes⁶, Alessandra Gutierrez de Oliveira^{7,4}, Eliane Mattos Piranda^{1,4*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, FAMEZ/UFMS, Mato Grosso do Sul, Brasil.

²Médico Veterinário da Secretaria Municipal de Saúde de Camapuã/MS - Setor de Zoonoses, Mato Grosso do Sul, Brasil.

³Instituto Integrado de Saúde, INISA/UFMS, Mato Grosso do Sul, Brasil

⁴Laboratório de Parasitologia Humana, Inbio/UFMS, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁵Aluno de Iniciação Científica, FAMEZ/UFMS, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁶Laboratório de Patologia, Inbio/UFMS, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁷Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias FAMED/UFMS, Mato Grosso do Sul, Brasil.

***Autor correspondente:** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS
Cidade Universitária, s/n., Campo Grande - MS, Brasil. CEP: 79070-900
Telefone:(55)(67) 3345-7369; email:eliane.piranda@ufms.br

Abstract

The diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) is one of the major obstacles to its control, given the variety of clinical manifestations presented. Thus, this study evaluated the response to TR-DPP® and the clinical manifestations of dogs naturally infected with *Leishmania* sp., in areas of intense (Campo Grande) and sporadic (Camapuã) transmission of visceral leishmaniasis (VL) in the State of Mato Grosso do Sul. The TR-DPP® presented superior performance in the identification of symptomatic animals when compared to asymptomatic animals in both regions, however higher sensitivity (92%) and specificity (71%) values were observed in Campo Grande when compared to the test performance in Camapuã (sensitivity 65%, specificity 53%). The cutoff point of the clinical scoring system ≥ 3 obtained better performance in distinguishing CVL positive dogs from CVL negative dogs from Campo Grande, with sensitivity of 79.01% and specificity of 73.91%. In Camapuã, this cutoff point presented the same specificity, but lower sensitivity (39.63%). It is concluded that the use of TR-DPP® as a screening method and the clinical scoring system should be performed cautiously in regions of sporadic transmission of VL.

Keywords: Campo Grande, Camapuã, Canine visceral leishmaniasis, Clinical signs, Immunochromatographic test

Resumo

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) é um dos maiores entraves para seu controle, frente à variedade de manifestações clínicas apresentadas. Este trabalho avaliou a resposta ao TR-DPP® e as manifestações clínicas de cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. por um sistema de pontuação clínica, em áreas de transmissão intensa (Campo Grande) e esporádica (Camapuã) para leishmaniose visceral (LV) no Estado de Mato Grosso do Sul. O TR-DPP® apresentou desempenho superior na identificação de animais sintomáticos, comparados aos assintomáticos em ambas as regiões; no entanto valores de sensibilidade (92%) e especificidade (71%) superiores foram observados em Campo Grande, comparados a performance do teste em Camapuã (sensibilidade 65%, especificidade 53%). O ponto de corte do sistema de pontuação clínica ≥ 3 obteve melhor

desempenho em distinguir cães LVC positivos de cães LVC negativos em Campo Grande, com sensibilidade de 79,01% e especificidade de 73,91%. Em Camapuã este ponto de corte obteve a mesma especificidade, porém sensibilidade inferior (39,63%). Conclui-se que a utilização do TR-DPP® como triagem e do sistema de pontuação clínica deve ser realizada com cautela em regiões de transmissão esporádica de LV.

Palavras-chave: Campo Grande, Camapuã, Leishmaniose visceral canina, Sinais clínicos, Teste imunocromatográfico

Introdução

A leishmaniose visceral americana (LVA) é uma antroponose causada pelo protozoário flagelado *Leishmania infantum*, transmitido durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotômíneos (Psychodidae: Phlebotominae (GRIMALDI & TESH, 1993). É caracterizada como uma enfermidade debilitante, capaz de reduzir os anos de vida produtiva e levar a morte do indivíduo; trata-se de uma doença de caráter crônico que cursa geralmente com internação do paciente e uma média de permanência no hospital de 14,9 dias, sendo, portanto, considerada a terceira doença infecciosa de prioridade no mundo e responsável por elevados gastos na saúde pública do país (WHO/TDR/2007; OLIVEIRA et al., 2010).

O Brasil é responsável por cerca de 90% dos casos de LVA na América Latina, sendo esta de notificação compulsória e registrada nas cinco regiões do país (ALVAR et al., 2012; PEIXOTO et al., 2015). O Estado de Mato Grosso do Sul, teve 1.605 casos humanos confirmados e 112 óbitos registrados, no período de 2010 a 2017, com 125 novos casos humanos registrados apenas no último ano. Quanto a incidência da doença no Estado, são cinco municípios classificados pelo Ministério da Saúde como área de transmissão intensa de LVA (média de casos nos último cinco anos igual ou superior a 4,4), dentre eles a capital do Estado, Campo Grande; quatro municípios de transmissão moderada (média de casos entre 2,4 e 4,3) e 32 municípios categorizados como área de transmissão esporádica (média de casos menor que 2,4) (MATO GROSSO DO SUL, 2017).

No país, as medidas de controle à LVA preconizadas pelo Ministério da Saúde incluem o diagnóstico precoce e tratamento dos humanos; controle do vetor e eliminação dos cães soropositivos. Os animais são triados por meio do teste rápido imunocromatográfico (TR-DPP® Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brasil) e tem o diagnóstico confirmado por meio da reação de imunoadsorção enzimática (ELISA), na qual, se positivos, são destinados à eutanásia (BRASIL, 2014).

Os cães são considerados importantes reservatórios de *L. infantum* devido à alta carga parasitária apresentada na pele, facilitando a infecção do vetor pelo parasita, mesmo quando estes animais estão assintomáticos (LAURENTI et al., 2013). Ademais, a enzootia canina usualmente precede os casos humanos, refletindo a importância do monitoramento da infecção canina como um possível marcador de transmissão e (re)emergência de LVA (PARANHOS-SILVA et al., 1996; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016).

No entanto, o diagnóstico preciso da leishmaniose visceral canina (LVC) é um dos maiores entraves para o controle desta zoonose devido à variedade de manifestações clínicas apresentadas pelos animais infectados. Além disso, as manifestações clínicas apresentadas na LVC são compatíveis com outras enfermidades, circunstância que inviabiliza o diagnóstico apenas clínico da LVC (PINELLI et al., 1994; QUINNELL et al., 2001; MORENO & ALVAR, 2002)

Desta maneira, faz-se necessário uma associação de métodos laboratoriais e dados epidemiológicos para a conclusão do diagnóstico da LVC. Os métodos parasitológicos são considerados métodos diagnósticos padrão ouro, porém demandam tempo e profissionais qualificados para sua execução; já as técnicas moleculares são dispendiosas e requerem laboratórios equipados para seu desenvolvimento (GONTIJO & MELO, 2004). Neste contexto, os métodos sorológicos são amplamente utilizados devido à hipergamaglobulinemia observada nos cães infectados e por serem técnicas menos invasivas e facilmente executadas em estudos epidemiológicos (FONSECA et al., 2014).

Contudo, alguns fatores interferem na sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos como o antígeno utilizado e também a prevalência da transmissão de *L. infantum*, a qual se apresenta de forma heterogênea no país, gerando desafios adicionais ao diagnóstico da LVC em regiões de baixa prevalência da enfermidade (GONTIJO & MELO, 2004; PEIXOTO et al., 2015; MENDONÇA et al., 2017). Frente a estes impasses do diagnóstico da LVC, Silva et al. (2017) elaboraram um sistema de pontuação clínica que visa diagnosticar os animais infectados em regiões onde há poucos recursos diagnósticos para confirmação da doença.

Assim, este estudo avaliou as manifestações clínica e a resposta ao TR-DPP® em cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. em áreas de transmissão intensa (Campo Grande) e esporádica (Camapuã) para leishmaniose visceral (LV) no Estado de Mato Grosso do Sul.

Material e métodos

Aspectos éticos:

Este projeto possui aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob o protocolo número 645/2014 para os animais de Camapuã e 697/2015 para os animais de Campo Grande.

População de estudo:

O conjunto amostral deste estudo foi composto por cães procedentes de Campo Grande, município classificado pelo Ministério da Saúde como região de intensa transmissão para *L. infantum*, e Camapuã, município de transmissão esporádica. Em Campo Grande foram coletadas 205 amostras provenientes de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e de atendimentos particulares entre 2016 e 2017. Em Camapuã as 284 amostras coletadas foram provenientes do inquérito sorológico epidemiológico do serviço de vigilância em saúde do município realizado em 2015. Os critérios de inclusão adotados neste estudo foram: animais residentes no município de Campo Grande e Camapuã com idade superior a quatro meses e cujos tutores consentiram com o termo de consentimento livre esclarecido

Análise clínica:

Todos os cães foram examinados clinicamente e classificados segundo Silva et al. (2017). Um conjunto de 15 diferentes sinais clínicos foram considerados para classificação dos cães conforme a presença ou gravidade dos sinais. De acordo com o escore total dos animais, estes foram classificados em assintomáticos (zero a três pontos) ou sintomáticos (mais de três pontos).

Coleta das amostras biológicas:

Para cada animal avaliado clinicamente foi coletada uma amostra de 10mL de sangue periférico com auxílio de tubos do tipo *Vacutainer*® por meio de venopunção jugular. A amostra foi armazenada em um frasco estéril com EDTA para pesquisa de hemoparasitas por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e em outro tubo com ativador de coagulação para obtenção do soro.

Diagnóstico Parasitológico Direto:

A pesquisa direta de formas amastigotas do protozoário *Leishmania* spp. em esfregaços de aspirado de linfonodo foi realizada no Laboratório de Parasitologia Humana (Inbio/UFMS). As lâminas foram coradas com Giemsa e submetidos à visualização por meio de microscopia de campo claro com objetiva de 100x.

Diagnóstico Sorológico de leishmaniose visceral canina:

Teste rápido imunocromatográfico TR-DPP®:

Foi utilizado o teste rápido imunocromatográfico TR-DPP® (Dual-Path Platform immunochromatographic test – Leishmaniose Visceral Canina, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ – Rio de Janeiro, Brasil) com amostra de soro de cada animal, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

Reação de imunoabsorção enzimática (ELISA-SLA):

Os animais negativos na pesquisa de amastigota de *Leishmania* sp. e no TR-DPP® foram submetidos ao ELISA com antígeno total de *L. infantum* (SLA). As placas

sensibilizadas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Manuel Soto (Departamento de Biologia Molecular Severo Ochoa, Universidade Autônoma de Madrid). A determinação da concentração das proteínas foi realizada pelo Método de Bradford (1976). A técnica de ELISA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular (Inbio/UFMS), utilizando placas de 96 poços de poliestireno de superfície MaxiSorp™ (NUNC/ Thermo Scientific), que foram previamente sensibilizadas com o antígeno total de *L. infantum* na concentração de 2µg/mL, diluído em tampão Ureia 3M pH 8, e incubadas *overnight* à 4°C. Após a incubação o conteúdo das placas foi desprezado e estas lavadas por três vezes com 200 µL por poço de Wash Buffer – PBS-TB (PBS + 0,5% Tween 20). Em seguida foi realizado o bloqueio dos poços com 200 µL por poço de Blocking Buffer - BB (PBS-TB com 5% de leite desnatado) e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Após o bloqueio as placas foram lavadas quatro vezes com 200 µL de PBS-TB (PBS + 0,5% Tween 20) por poço. A diluição dos soros caninos utilizados foi de 1:400 em BB (PBS-TB com 5% de leite desnatado), logo após adicionado 100 µL em cada poço e incubados por 2h. Seguiram-se novamente etapas de lavagem descritas anteriormente. Realizou-se nova incubação com o conjugado anti-cão marcado com peroxidase (SIGMA N° cat: A6792), durante 1h, numa diluição de 1:6000 em BB (PBS-TB com 5% de leite desnatado). Seguiram-se novamente etapas de lavagem. Para revelação das reações foram utilizadas primeiramente cápsulas de tampão citrato-fosfato com perborato de sódio (PCB) (SIGMA N° cat: P4922) diluídas em água destilada (uma capsula para 100 mL de água destilada), acrescentou-se depois duas pastilhas de OPD 20 mg (o-phenylenediamine dihydrochloride) (Sigma Chemical Company – P7288), e por fim adicionando-se 200 µL por poço, após 20 min. em câmara escura a reação foi interrompida com solução de parada (H₂SO₄ 3N) com 50 µL por poço (adaptado de SOTO et al., 2015). A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm, utilizando o aparelho Spectra Max 190.

Diagnóstico das hemoparasitoses:

Apenas as amostras de sangue periférico com EDTA de cães negativos para LVC no exame parasitológico direto e ambos os exames sorológicos (TR-DPP® e ELISA-

SLA) foram destinadas à pesquisa de hemoparasitas por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), realizada no Laboratório de Biologia Molecular (Inbio/UFMS). As reações de PCR foram realizadas em três etapas, na seguinte ordem: primeiramente os animais foram submetidos à pesquisa de *Ehrlichia canis*; aqueles negativos na primeira etapa foram submetidos à pesquisa de *Babesia canis* e os animais negativos na segunda etapa foram submetidos à pesquisa de *Anaplasma platys*.

Obtenção dos controles positivos:

Os controles positivos para os agentes *B. canis* e *A. platys* foram padronizados e fornecidos pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista – campus de Jaboticabal. O controle positivo para o agente *E. canis* foi padronizado e fornecido pelo Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEZ) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Extração do DNA:

O material genômico (DNA total) presente em cada amostra foi extraído a partir de uma alíquota de 200µL de sangue coletado com EDTA e congelado (-20°C), utilizando-se o *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen™), de acordo com as especificações do fabricante. O DNA extraído foi aliquoteado em tubos de polipropileno de 1,5mL estéreis, identificados e armazenados a -20°C, para utilização na PCR.

Técnica da Reação em cadeia da polimerase:

Nas reações de PCR, para um volume final de 25µL de reação foi adicionado: 5µL de amostra nas reações de PCR convencional e 1µL de DNA-amostra na reação de nested PCR (nPCR); 12,5µL de *GoTaq® Green Master Mix* (Promega®), 5,5µL de água nas reações de PCR convencional e 9,5µL nas reações de nPCR; e 1µL de cada oligonucleotídeo (diluídos para ter uma concentração final de 10pmol/µL, com exceção dos oligonucleotídeos para reação de *Anaplasma platys*, na qual a concentração final foi de 20pmol/µL). Todas as reações foram realizadas no termociclador Bio-Rad T100.

Gene betaglobina:

Esta etapa foi realizada com o objetivo de comprovar se a etapa de extração de DNA foi bem-sucedida, de forma a validar as amostras submetidas à PCR. Foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores nessa PCR: β globina (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3') e β globina 01 (5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3'). As condições de amplificação foram as seguintes: 95°C por 3 min., seguido de 34 ciclos de 95°C por 30 seg., 55°C por 30 seg. para anelamento e 72°C por 60 seg. para extensão. No último ciclo a extensão final foi realizada a 72°C por 5 min (adaptado de GREER et al., 1991).

Diagnóstico molecular de Ehrlichia canis:

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados são denominados ECC (senso ou “forward”) e ECB (anti-senso ou “reverse”) derivados do gene 16S rRNA, os quais amplificam todas as *Ehrlichia* spp. (DAWSON et al., 1994; 1996) e fornecem um amplímero de aproximadamente 478 pares de bases. As seqüências desses oligonucleotídeos iniciadores são: ECC (5'-AGA ACG AAC GCT GGC GGC AAG C-3') e ECB (5'-CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC A-3') (DAWSON et al., 1994; 1996). As condições de amplificação durante a reação foram: 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C, 1 minuto a 72°C, com pós-extensão a 72°C por 5 minutos em termociclador (D'AGNONE, 2006). Após a PCR do gênero com ECC/ECB, foi realizada uma nested PCR (nPCR), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores derivados do gene 16S rRNA denominados “canis” (5'-CAA TTA TTT ATA GCC TCT GGC TAT AGG A-3') e GA1UR (5'-GAC TTT GCC GGG ACT TCT TCT-3') (WANER & DAWSON, 1996), os quais amplificam um amplímero de aproximadamente 358 pares de bases. As condições de amplificação durante a reação foram: 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C e pós-extensão a 72°C por 5 minutos em termociclador (D'AGNONE, 2006).

Diagnóstico molecular de Babesia canis:

Utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores denominados Piro-A (5'-AAT ACC CAA TCC TGA CAC AGG-3') e Piro-B (5'-TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC-3'), os quais amplificam um amplímero de aproximadamente 400 pares de bases, derivado do gene 18S rRNA para todas as espécies (CARRET et al., 1999). As condições de amplificação durante a reação foram adaptadas de D'agnone (2006): 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57,5°C, 1 minuto a 72°C e pós-extensão a 72°C por 5 minutos em termociclador.

Diagnóstico molecular de Anaplasma platys:

Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores denominados Platys -F (5'-AAG TCG AAC GGA TTT TTG TC-3') e Platys-R (5'-CTT TAA CTT ACC GAA CC-3'), os quais amplificam um amplímero de aproximadamente 503 pares de bases (INOKUMA et al., 2002). As condições de amplificação durante a reação foram: 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 90 segundos a 72°C e pós-extensão de 72°C a 5 minutos em termociclador (D'AGNONE, 2006).

Eletroforese:

A identificação dos produtos amplificados foi feita por meio de eletroforese com gel de agarose a 1,5% em 100mL de Tris-Borato de EDTA (TBE), corados com Gel Red® e submetidos à corrida eletroforética a 100 volts por 100 min. Em solução tampão tris-borato EDTA (TBE) 1x. A visualização das bandas amplificadas sob incidência de luz ultravioleta, com filtro de 300 nm.

Formação dos grupos amostrais para metodologia de avaliação clínica (SILVA et al., 2017):

As técnicas diagnósticas descritas foram realizadas com intuito de formar os seguintes grupos amostrais: I. cães originários de Campo Grande diagnosticados com LVC pelo exame parasitológico direto; II. cães originários de Camapuã diagnosticados com LVC pelo exame parasitológico direto; III. cães originários de Campo Grande ou Camapuã, negativos para LVC (exame parasitológico direto, TR-DPP® e ELISA-SLA)

e negativos para hemoparasitoses; IV. cães originários de Campo Grande ou Camapuã, negativos para LVC (exame parasitológico direto, TR-DPP® e ELISA-SLA) e positivo para hemoparasitose (*B. canis* e/ou *E. canis* e/ou *A. platys*). Assim, no total foram utilizados 179 animais para compor os grupos amostrais, selecionados de acordo com seus perfis clínicos e de maneira categorizada, de forma que os grupos foram compostos da seguinte maneira: grupo I (81 animais), grupo II (53 animais), grupo III (23 animais), grupo IV (22 animais).

Análise estatística:

Para avaliar a performance dos testes diagnósticos, os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, índice *kappa* de concordância e área sob a curva foram calculados utilizando o software MedCalc (SCHOONJANS et al., 1995). A análise da curva ROC (*receiver operator characteristic*) foi utilizada para estabelecer o valor de corte do escore clínico capaz de discriminar animais negativos e positivos para LVC e esta foi realizada por meio do software GraphPad Prism 6.0 (Graph Pad Software Inc., USA). Para análise dos sinais clínicos, o teste de proporção para duas amostras independentes baseado na distribuição qui-quadrado de Pearson foi utilizado e executado com o auxílio do software R versão 3.4.0 (R CORE TEAM, 2017).

Resultados

TR-DPP®

Foram avaliados 284 cães provenientes de Camapuã, dos quais apenas 53 (18,66%) foram positivos no exame parasitológico direto e considerados positivos para LVC; no entanto, 21 (39,62%) destes animais não foram detectados pelo teste de triagem empregado pelo Ministério da Saúde, o TR-DPP®. Enquanto em Campo Grande, a taxa de positividade para LVC por meio do exame parasitológico dos 205 cães avaliados foi de 39,51% (81 animais), com 12 (14,81%) destes negativos no exame sorológico TR-DPP®. Desta maneira, a concordância observada entre o exame parasitológico e o TR-DPP®, avaliada através do índice *kappa* (Landis & Koch, 1977), foi razoável (0,226;

$p < 0,001$) em Camapuã e substancial (0,632; $p < 0,001$) em Campo Grande. Os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e área sob a curva do teste imunocromatográfico TR-DPP®, aplicados nos dois municípios estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e área sob a curva (intervalo de confiança de 95%) para o teste rápido imunocromatográfico TR-DPP®, realizado nos municípios de Camapuã (n=284 cães) e Campo Grande (n=205 cães).

Local	Perfil	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Área sob a curva
		(IC 95%)	(IC 95%)			(p-value)
Campo Grande	Sintomáticos	0,92	0,71	0,77	0,89	0,82 ($p < 0,001$)
	Assintomáticos	0,67	0,87	0,61	0,90	0,77 ($p < 0,001$)
	Total	0,85	0,80	0,74	0,89	0,83 ($p < 0,001$)
Camapuã	Sintomáticos	0,65	0,53	0,35	0,79	0,59 ($p = 0,200$)
	Assintomáticos	0,58	0,74	0,30	0,90	0,66 ($p < 0,001$)
	Total	0,67	0,71	0,35	0,90	0,69 ($p < 0,001$)

Sinais clínicos

A partir dos resultados obtidos nos testes diagnósticos realizados, os animais foram alocados de forma categorizada nos seguintes grupos: cães originários de Campo Grande diagnosticados com LVC pelo exame parasitológico direto (n= 81 animais); cães originários de Camapuã diagnosticados com LVC pelo exame parasitológico direto (n= 53 animais); cães originários de Campo Grande ou Camapuã, negativos para LVC (exame parasitológico direto, TR-DPP® e ELISA-SLA) e negativos para hemoparasitoses (n= 23 animais) e por fim, cães originários de Campo Grande ou Camapuã, negativos para LVC (exame parasitológico direto, TR-DPP® e ELISA-SLA) e positivo para outra hemoparasitose (*B. canis* e/ou *E. canis* e/ou *A. platys*) (n= 22 animais). Assim, no total foram utilizados 179 animais na análise da frequência dos sinais clínicos observados, disposta nas Tabelas 2 e 4.

Foi observado que sinais clínicos tais como linfadenomegalia ($p<0,001$), pelagem ruim/opaca ($p<0,05$), dermatite esfoliativa ($p<0,001$), onicogrifose ($p<0,001$), estado nutricional ruim ($p<0,001$), presença de secreção ocular ($p<0,05$) mucosas pálidas ($p<0,05$) e despigmentação de focinho ($p<0,05$), apresentaram frequências distintas nos cães de área de transmissão intensa de leishmaniose visceral quando comparados a cães de área de transmissão esporádica (Tabela 2). Além disso, o número de animais diagnosticados com LVC classificados como sintomáticos de acordo com a metodologia de Silva et al. (2017), com escore >3 , foi superior em Campo Grande (74,07%), comparado a Camapuã (30,19%) (Tabela 3).

Tabela 2. Frequência dos sinais clínicos em cães com leishmaniose visceral canina (LVC) provenientes de Campo Grande (n=81 animais) e Camapuã (n=53 animais).

Sinais clínicos	1	2	χ^2 (p-value) 1 vs 2
	LVC (+) CG n=81	LVC (+) C n=53	
Linfadenomegalia	64 (79,01%)	27 (50,94%)	11,58 (p=0,0006)
Pelagem ruim/opaca	46 (56,79%)	19 (35,85%)	5,62 (p=0,0177)
Alopecia	37 (45,68%)	19 (35,85%)	0,90 (p=0,3426)
Dermatite esfoliativa	36 (44,44%)	5 (9,43%)	16,88 (p<0,0001)
Onicogrifose	35 (43,21%)	7 (13,21%)	13,40 (p=0,0002)
Estado nutricional ruim	31 (38,27%)	4 (7,55%)	14,12 (p=0,0001)
Secreção ocular	29 (35,80%)	6 (11,32%)	9,95 (p=0,0016)
Mucosas pálidas	26 (32,10%)	8 (15,10%)	4,89 (p=0,0269)
Lesão em ponta de orelha	25 (30,86%)	13 (24,53%)	0,63 (p=0,4262)
Despigmentação de focinho	18 (22,22%)	2 (3,77%)	7,19 (p=0,0073)
Despigmentação de lábio	16 (19,75%)	4 (7,54%)	2,86 (p=0,0908)
Lesão em focinho	14 (17,28%)	3 (5,66%)	2,93 (p=0,0870)
Blefarite	13 (16,05%)	3 (5,66%)	2,37 (p=0,1233)
Sangramento	7 (8,64%)	0 (0,0%)	-
Lesão em lábio	5 (6,17%)	1 (18,86%)	0,55 (p=0,4557)

Tabela 3. Percentual de animais positivos no parasitológico de linfonodo para LVC provenientes de Campo Grande (CG +, n=81) e Camapuã (C +, n=53) e dos animais negativos para LVC (parasitológico de linfonodo, TR-DPP®, ELISA-SLA) e outros hemoparasitas (*Ehrlichia canis*, *Babesia canis* e *Anaplasma platys*), provenientes de Campo Grande (CG -, n=12) e Camapuã (C -, n=11) de acordo com o escore clínico.

Local	Escore	Número de cães +	Percentual % +	Número de cães -	Percentual % -
CG	0	6	7,41	3	25,00
	1	1	1,23	2	16,67
	2	6	7,41	2	16,67
	3	8	9,88	0	0,00
	4	5	6,17	1	8,33
	5 a 7	21	25,93	3	25,00
	8 a 10	14	17,28	1	8,33
	≥11	20	24,69	0	0,00
C	0	12	22,64	7	63,64
	1	8	15,09	2	18,18
	2	7	13,21	1	9,09
	3	10	18,87	0	0,00
	4	7	13,21	1	9,09
	5 a 7	3	5,66	0	0,00
	8 a 10	3	5,66	0	0,00
	≥11	3	5,66	0	0,00

Cinco sinais clínicos presentes em cães com LVC demonstraram frequências distintas dos animais negativos para LVC e hemoparasitas (Tabela 4), sendo eles: linfadenomegalia ($p<0,001$), pelagem ruim/opaca ($p<0,05$), alopecia ($p<0,05$), onicogribose ($p<0,05$) e lesão em ponta de orelha ($p<0,05$). Entretanto, quando os sinais clínicos do grupo infectado com *L. infantum* foram comparados ao grupo de animais negativos para LVC, porém infectados com outros hemoparasitas (*B. canis* e/ou *E. canis* e/ou *A. platys*), apenas a frequência de linfadenomegalia observada nos cães positivos para LVC se diferenciou dos demais sinais observados nesta população ($p = 0,0410$) (Tabela 4)

Tabela 4. Frequência dos sinais clínicos em cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC +) (n=134 animais), cães negativos para LVC e negativos para outros hemoparasitas (LVC – HEMOP -, n=23 animais) e cães negativos para LVC e positivo para hemoparasitas (*Babesia canis* e/ou *Ehrlichia canis* e/ou *Anaplasma platys*) (LVC – HEMOP +, n=22 animais), provenientes de Campo Grande e Camapuã.

Sinais clínicos	1	2	3	χ^2 (p-value) 1 vs 2	χ^2 (p-value) 1 vs 3
	LVC + n=134	LVC - HEMOP - n=23	LVC - HEMOP + n=22		
Linfadenomegalia	91 (67,91%)	5 (21,74%)	10 (45,45%)	15,73 (p<0,0001)	4,17 (p=0,0410)
Pelagem ruim/opaca	65 (48,50%)	4 (17,39%)	6 (27,27%)	6,50 (p=0,0107)	3,44 (p=0,0638)
Alopecia	56 (41,79%)	4 (17,39%)	8 (36,36%)	3,97 (p=0,0463)	0,06 (p=0,8058)
Onicogribose	42 (31,34%)	1 (4,35%)	5 (22,73%)	5,90 (p=0,0151)	0,32 (p=0,5716)
Dermatite esfoliativa	41 (30,60%)	3 (13,04%)	5 (22,73%)	2,19 (p=0,1388)	0,25 (p=0,6185)
Lesão em ponta de orelha	38 (28,36%)	1 (4,35%)	6 (27,27%)	4,84 (p=0,0277)	0,01 (p=0,9165)
Estado nutricional ruim	35 (26,12%)	3 (13,04%)	4 (18,18%)	1,18 (p=0,2761)	0,28 (p=0,5952)
Secreção ocular	35 (26,12%)	5 (21,74%)	9 (40,91%)	0,20 (p=0,656)	2,04 (p=0,1531)
Mucosas pálidas	34 (25,37%)	3 (13,04%)	4 (18,18%)	1,04 (p=0,3071)	0,21 (p=0,6453)
Despigmentação de lábio	20 (14,93%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	-	-
Despigmentação de focinho	20 (14,93%)	1 (4,35%)	3 (13,64%)	1,09 (p=0,2959)	0,00 (p=1,0)
Lesão em focinho	17 (12,69%)	1 (4,35%)	5 (22,73%)	0,65 (p=0,4206)	0,85 (p=0,3557)
Blefarite	16 (11,94%)	0 (0,0%)	1 (4,55%)	-	0,44 (p=0,5076)
Sangramento	7 (5,22%)	1 (4,35%)	1 (4,55%)	0,00 (p=1,0)	0,00 (p=1,0)
Lesão em lábio	6 (4,48%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	-	-

Escore clínico

O escore total para distinguir animais LVC positivos de área de intensa transmissão de LVA de animais LVC negativos e negativos para outros hemoparasitas teve área sob a curva (ASC) de 0,842 ($p < 0,0001$). Nesta análise, o ponto de corte ≥ 3 apresentou o melhor desempenho, com sensibilidade de 79,01% e especificidade de 73,91%. Já o escore total utilizado para diferenciar cães LVC positivos provenientes de área de transmissão esporádica dos cães negativos para LVC e hemoparasitas demonstrou valor de ASC de 0,620 ($p = 0,098$) e o mesmo ponto de corte aplicado em Campo Grande apresentou sensibilidade inferior (39,62%) nas amostras de Camapuã, porém manteve a mesma especificidade (Tabela 5). Valores de ponto de corte acima de cinco não foram incluídos devido à baixa sensibilidade e irrelevância epidemiológica.

Tabela 5. Sensibilidade e especificidade dos pontos de corte na distinção de animais negativos para leishmaniose visceral canina (LVC) e hemoparasitoses (*Babesia canis* e/ou *Ehrlichia canis* e/ou *Anaplasma platys*) provenientes de Campo Grande e Camapuã (n=23 animais) de animais positivos para LVC provenientes de Campo Grande (LVC + CG, n=81 animais) e de animais positivos para LVC provenientes de Camapuã (LVC + C, n= 53 animais).

Grupo	Escore	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
LVC + CG	1	91,36	52,18
	2	87,66	67,39
	3	79,01	73,91
	4	70,99	78,26
	5	62,35	84,79
LVC + C	1	69,81	52,18
	2	55,66	67,39
	3	39,63	73,91
	4	23,59	78,26
	5	14,15	84,79

Já na análise da sensibilidade e especificidade dos pontos de corte para distinguir os animais positivos para LVC, provenientes de Campo Grande e Camapuã, de animais

doentes com outras hemoparasitoses, o escore total apresentou ASC de 0,579 ($p=0,232$) e o melhor ponto de corte observado foi ≥ 4 , entretanto o mesmo apresenta valores de sensibilidade e especificidade inferiores, 52,24% e 59,09% respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Sensibilidade e especificidade dos pontos de corte na distinção de animais positivos para hemoparasitas (*Babesia canis* e/ou *Ehrlichia canis* e/ou *Anaplasma platys*), proveniente de Campo Grande e Camapuã (n=23 animais) de animais positivos para LVC provenientes de Campo Grande e Camapuã (LVC +, n=134 animais).

Grupo	Escore	Sensibilidade	Especificidade
	1	83,21	20,46
	2	75,00	34,09
	3	63,44	45,46
	4	52,24	59,09
LVC +	5	43,29	70,46

Discussão

O teste de triagem TR-DPP®, composto por uma fusão de antígenos recombinantes de *L. infantum*, rK9, rK26 e rK39 é utilizado no Brasil como método de triagem para diagnóstico da LVC (BRASIL, 2011). Neste estudo, foi notável a disparidade presente entre os valores de sensibilidade e especificidade do TR-DPP® aplicados em cães de municípios epidemiologicamente distintos, fato também evidenciado pelos valores discrepantes do índice *kappa* entre Campo Grande e Camapuã.

Uma ferramenta diagnóstica de triagem para LVC deve possuir alta sensibilidade para detectar animais possivelmente infectados presentes na população, os quais podem atuar como fonte de infecção para o vetor e contribuir para o aumento do número de casos caninos e humanos (LAURENTI et al., 2013; 2014). A sensibilidade inferior observada no desempenho do TR-DPP® em Camapuã é alarmante uma vez que animais positivos não serão detectados e permanecerão na população, subestimando a prevalência da infecção canina no município. Estes fatores são preocupantes posto que o planejamento

de medidas de vigilância e controle da enfermidade devem ser baseadas nos dados de prevalência do município (BRASIL, 2014).

Ainda que o desempenho do TR-DPP® seja inferior para triar animais positivos provenientes de região de transmissão esporádica, o teste apresentou valores preditivos negativos similares na análise geral de ambos os municípios. Fato este que reforça a utilidade do teste, aliado à sua praticidade de aplicação a campo, em segregar os animais verdadeiramente negativos, os quais serão mantidos na população. Esta é uma característica desejável em um teste diagnóstico (KAWAMURA, 2002) e que pode sugerir seu emprego como teste confirmatório. Laurenti et al. (2014) também propuseram sua utilização como método confirmatório após observarem valores de especificidade e valor preditivo positivo superiores ao ELISA (Biomanguinhos). Para mais, Coura-Vital et al. (2014) também recomendam o TR-DPP® como teste confirmatório, particularmente em áreas de alta demanda, devido a sua facilidade de uso e menor custo financeiro. Contudo é necessário enfatizar que não foi avaliado neste trabalho a ocorrência de reações cruzadas no TR-DPP® com outros hemoparasitas, fato que impossibilita uma avaliação precisa de sua especificidade.

O TR-DPP® foi mais sensível para detecção de animais sintomáticos em ambas as localidades, as quais apesar de diferirem quanto a classificação de transmissão de LVA, são áreas endêmicas para LVC. Resultado semelhante também foi observado por Grimaldi et al. (2012), os quais relataram desempenho inferior (47%) ao testarem amostras de cães assintomáticos de uma área rural do Espírito Santo endêmica para LVC. A discrepância observada na performance de um teste sorológico para diagnóstico da LVC em cães sintomáticos e assintomáticos é plausível uma vez que a expressividade dos sinais clínicos se altera durante o curso da doença e está correlacionada à positividade nos exames diagnósticos para a enfermidade (QUINNEL et al., 2001; 2013; SILVA et al., 2017).

Dentre as razões para as diversas formas de manifestações clínicas apresentadas na LVC estão fatores relacionados ao hospedeiro, tais como a parasitemia e competência do sistema imune do cão e elementos atribuídos ao parasita, como local de inoculação e

sua capacidade patogênica, os quais irão influenciar no estágio da infecção por *L. infantum* e no fenótipo clínico e produção de anticorpos durante a doença (GRIMALDI & TESH, 1993; QUINNEL et al., 2001).

Contraditoriamente aos resultados expostos, Laurenti et al. (2014), demonstraram valores superiores de sensibilidade no diagnóstico de cães assintomáticos (92,1%) quando comparados aos sintomáticos (89,4%) por meio do TR-DPP®. Estes autores justificaram que os cães envolvidos em seu estudo poderiam estar em um estado ativo da infecção, com progressão para doença.

Os sinais clínicos frequentemente observados na LVC relatados em literatura são: linfadenomegalia, perda de peso, alterações dermatológicas, onicogrifose, hepatomegalia, esplenomegalia, glomerulopatias, claudicação, epistaxe e lesões oculares (MOREIRA et al., 2007; MAIA & CAMPINO, 2008). Assim como em outros estudos (CIARAMELLA et al., 1997; MORENO & ALVAR, 2002; AMUSATEGUI et al., 2003; MANNA et al., 2009; SILVA et al., 2017), linfadenomegalia foi o sinal clínico mais frequente observado em ambas as regiões avaliadas neste estudo. Pelagem ruim/opaca e alopecia se destacaram em seguida nos dois municípios; sendo assim, os três sinais clínicos observados mais comumente em cães com LVC das regiões estudadas tratam-se de manifestações inespecíficas, as quais podem estar presentes em outras hemoparasitoses ou desordens dermatológicas como a dermatofitose e a dermatite atópica canina (GONTIJO & MELO, 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; HENSEL et al., 2015; SILVA et al., 2017).

Já quando os sinais clínicos manifestados por animais naturalmente infectados por *L. infantum* são comparados ao grupo de animais negativos para LVC e hemoparasitoses, sinais clínicos mais específicos para LVC como lesão em ponta de orelha e onicogrifose se destacaram, manifestando-se de forma distinta e mais frequente na população infectada. Onicogrifose também esteve altamente associada aos cães infectados com LVC provenientes de Teresina, Piauí, área endêmica para transmissão de LVC (Silva et al., 2017) e, assim como a dermatite esfoliativa de ponta de orelha, ambas são descritas como

sinais clínicos comumente manifestados na LVC (FERRER et al., 1988; CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

É possível perceber que os sinais clínicos se manifestaram de forma distinta entre as duas localidades, com maior ocorrência e maior intensidade dos sinais nos cães de área de transmissão intensa de LVA, de forma que estes apresentaram escores clínicos mais elevados. Opostamente, 69,81% dos cães diagnosticados como positivos para LVC em Camapuã foram assintomáticos. Contudo, é necessário salientar que a grande maioria dos cães avaliados em Campo Grande eram animais doentes que buscavam atendimento veterinário e, portanto, apresentavam alguma manifestação clínica. Já os animais provenientes de Camapuã, foram obtidos através de amostragem categorizada para realização do inquérito epidemiológico do município.

Silva et al. (2017) relataram que sua metodologia foi capaz de diagnosticar animais para LVC mesmo quando a infecção por *E. canis* não era previamente excluída, evidenciando diferença significativa entre a frequência de alguns sinais clínicos (linfadenomegalia, lesões em ponta de orelha/focinho, onicogribose, estado nutricional ruim, pelagem ruim/opaca) observados em cães positivos para LVC comparada aos cães infectados apenas com *E. canis*. No entanto, neste estudo, apenas a presença de linfadenomegalia se diferenciou ($p < 0,05$) entre os grupos LVC positivo e LVC negativos infectados com outros hemoparasitas. Este fato contribui para a ausência no presente estudo, de um valor de corte para escore clínico que apresente alta sensibilidade e especificidade e seja capaz de distinguir os animais positivos para LVC em uma população composta por animais infectados com outros hemoparasitas.

A presença de infecções por outros hemoparasitas dificulta o diagnóstico clínico da LVC uma vez que muitas das manifestações clínicas e laboratoriais apresentadas são semelhantes à LVC (CIARAMELLA et al., 1997). O diagnóstico sorológico também é prejudicado, visto que a ocorrência de reações cruzadas no TR-DPP® com *B. canis* já foi relatada (LAURENTI et al., 2014). Ademais, a presença de coinfeções pode acentuar a imunossupressão do animal, tornando o mesmo mais suscetível à infecção por *L. infantum*

e à apresentação de manifestações clínicas mais severas (HARRUS et al., 2003; OTRANTO et al., 2009; ANDRADE et al., 2014).

Silva et al. (2017) afirmam que a determinação do escore clínico do cão por meio de sua metodologia pode proporcionar aos médicos veterinários mais confiança no diagnóstico de animais com LVC em áreas com recursos diagnósticos escassos e sugerem o valor de corte ≥ 3 para identificação dos animais LVC positivos dentre animais negativos para *L. infantum* (sensibilidade de 73,21% e especificidade de 62,02%) e dentre animais LVC negativos infectados com *E. canis* (sensibilidade de 85,71% e especificidade de 86,36%). Este valor de corte também foi o melhor obtido na distinção de animais negativos e positivos para LVC em Campo Grande e proporcionou valores de sensibilidade e especificidade ainda superiores. Todavia, em Camapuã, município de transmissão esporádica de LVA, não foi possível identificar por meio da metodologia de Silva et al. (2017) um valor de corte eficiente para identificação dos animais com LVC.

Frente aos resultados apresentados, é possível observar distinção entre a apresentação clínica e resposta sorológica ao TR-DPP® dos cães provenientes de Campo Grande e Camapuã. Além da situação epidemiológica diferente entre ambas as regiões, com prevalências de LVC de 13,54% em 2015 e, 22,37% em 2012, respectivamente para Campo Grande e Camapuã (PMCG, 2012; BORGES, 2017); outros aspectos podem estar envolvidos nas dissemelhanças observadas como tempo de acomodação do parasita ao hospedeiro, posto que a primeira epidemia urbana de LVC em Campo Grande foi registrada em 2001 (FURLAN, 2010), enquanto Camapuã registrou seu primeiro caso humano de LVC apenas em 2007 (BRASIL, 2017). Além disso, evidencia-se que as espécies vetoras de flebotomíneos envolvidas na transmissão da leishmaniose visceral nos municípios são distintas. *Lutzomyia cruzi* é a espécie responsável pela transmissão de *L. infantum* em Camapuã (OLIVEIRA et al., 2017a,b; FERNANDES et al., 2017) e *Lutzomyia longipalpis* em Campo Grande (OLIVEIRA et al., 2006). Esse conjunto de fatores deve ser melhor investigado, dado que os mesmos poderiam ser responsáveis por uma variabilidade intraespecífica na cepa de *Leishmania infantum* envolvida na infecção

e, conseqüentemente, ocasionar respostas imunes e manifestações clínicas diferentes nos hospedeiros de cada região (FALQUETO et al., 2003; SCHRIEFER et al., 2005).

Conclusão

Apesar da metodologia de avaliação clínica contribuir no diagnóstico da enfermidade canina em áreas endêmicas de alta transmissão de LVA, o esquema de pontuação clínica não teve o desempenho esperado em áreas de transmissão esporádica, as quais usualmente são representadas por municípios menores que carecem de suporte laboratorial e técnico para realização do diagnóstico da enfermidade. Com relação ao TR-DPP®, ainda que seu desempenho seja inferior em triar animais positivos provenientes de região de transmissão esporádica, o teste apresentou valores preditivos negativos similares na análise geral de ambos os municípios. Fato este que reforça a utilidade do teste, aliado à sua praticidade de aplicação a campo, em segregar os animais verdadeiramente negativos, que serão mantidos na população.

Agradecimentos

Agradecemos aos professores Dr. Marcos Rogério André do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista – campus de Jaboticabal e Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos, do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEZ) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pelo fornecimento dos controles positivos para as reações em cadeia da polimerase. Agradecemos ao Prof. Dr. Manuel Soto (Departamento de Biologia Molecular Severo Ochoa, Universidade Autónoma de Madrid) pelo fornecimento das placas de ELISA sensibilizadas.

Referências

- 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):356-371.
- Amusategui I, SAINZ A, RODRIGUEZ F, TESOURO MA. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur J Epidemiol* 2003, 18(2):147-156, 2003.

Andrade GB, Barreto WTG, Santos LL, Ribeiro LRR, Macedo GC, Sousa KCM, et al. Pathology of dogs in Campo Grande, MS, Brazil naturally co-infected with *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *Rev Bras Parasitol Vet* 2014, 23(4):509-515.

Borges LM. *Aspectos zoonóticos da leishmaniose visceral em Camapuã, MS*. [Dissertação]. Mato Grosso do Sul: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul; 2017.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 7(72):248-54.

Brasil, Ministério da Saúde. Nota Técnica Conjunta nº 01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. *Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC)*. (Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública). Brasília, DF. Ministério da Saúde, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014.

Brasil. Ministério da Saúde. *Sistema de Informação de Agravos de Notificação*. Leishmaniose visceral: casos confirmados e notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação: Mato Grosso do Sul. Acesso em dezembro de 2017. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvMS.def>>

Carret C, Walas F, Carcy B, Grande N, Précigout E, Moubri K et al. *Babesia canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *J Eukaryot Microbiol* 1999; 46(3):298-303.

Ciaramella P, Oliva G, Luna R, 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):539-543.

Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Leal GGA, Moreira ND, et al. Evaluation of changes in canine diagnosis protocol adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a new protocol for diagnosis. *Plos One* 2014; 9:e91009.

D'agnone AS. *Caracterização molecular de espécies da família anaplasmatidae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal-SP e de Campo Grande-MS*. [Tese]. São Paulo: "Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"; 2006.

Dawson JE, Stallknecht DE, Howerth EW, Warner C, Biggie K, Davidson WR et al. Susceptibility of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the Etiologic Agent of Human Ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32(11):2725-2728.

- Dawson JE, Warner CK, Standaert S, Olson J G. The interface between research and the diagnosis of an emerging tick-borne disease, human ehrlichiosis due to *Ehrlichia chaffeensis*. *Arch Intern Med* 1996; 156(2):137-142.
- Falqueto A, Sessa PA, Ferreira A, Vieira VP, Santos CB, Vaz J et al. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98(8):1003-1010.
- Fernandes WS, Borges LM, Casaril AE, Oliveira EF, Infrán JOM, Piranda EM et al. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban area, Central-West of Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2017;59:e54. doi: 10.1590/S1678-9946201759054.
- Ferrer L, Rabanal L, Fondevila D, Ramos JA, Domingo M. Skin lesions in canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract* 1988; 29(6):381-388.
- Fonseca AM, Faria AR, Rodrigues FTG, Nagem RAP, Magalhães RDM, Cunha JLR, et al. Evaluation of three recombinant *Leishmania infantum* antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Trop* 2014; 137: 25-30. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.04.028.
- Furlan, MBG. Epidemia de leishmaniose visceral no município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. *Epidemiol Serv Saúde* 2010; 19(1):15–24.
- Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, Desafios e Perspectivas. *Ver Bras Epidemiol* 2004; 7(3):338-349.
- Greer CE, Peterson SL, Nancy HT, Kiviat B, Manos MM. PCR amplifications from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol* 1991; 95(2):117-124.
- Grimaldi JR, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993; 361(3):230-250.
- Grimaldi G, Teva A, Ferreira AL, Santos CB, Pinto IS, Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012;106(1):54-59.
- Harrus S, Waner T, Friedmann-Morvinski D, Fishman Z, Bark H, Harmelin, A. Down-regulation of MHC class II receptors of DH28 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 96(3-4):239-243.
- Hensel P, Santori D, Favrot C, Hill P, Griffin C. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Vet Res* 2015; 11:196. doi.org/10.1186/s12917-015-0515-5.

Inokuma HH, Fujii K, Matsumoto K, Okuda M, Nakagome K, Kosugi R, Hirakawa M, Onishi T. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. *Vet Parasitol* 2002; 110(1-2):145-152.

Kawamura, T. Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica. Eficiência de um teste. *Arq Bras Cardiol* 2002; 79(4):437-441.

Koutinas A, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc* 1999; 35(5):376-383.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33(1):159-174.

Laurenti MD, Rossi CN, Matta VLR, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol* 2013; 196(3-4):296-300.

Laurenti MD, Junior MVSL, Tomokane TY, De Lucca HLR, Aschar M, Souza CSF, 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.

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

Magalhães-Junior JT, Mota TF, Porfirio-Passos G, Laranjeira DF, Franke CR.; Barrouin-Melo SM. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. *Vet Parasitol* 2016; 223:120-126. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.04.031.

Manna L, Vitale F, Reale S, Vitale F, Gravino AE. Evidence for a relationship between leishmania load and clinical manifestations. *Res Vet Sci* 2009; 87(1):76-78.

Mato Grosso do Sul. Secretaria de Estado de Saúde. Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica. Gerência Estadual de Zoonoses. *Informe epidemiológico das leishmanioses* nº 5/2017. 2017.

Mendonça IL, Batista JF, Schallig H, Cruz MSP, Alonso DP, Ribolla PEM, et al. The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2017; 59:e39. doi: 10.1590/S1678-9946201759039

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Garcia JF, Corbett CEP, Laurenti MD. 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.

Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 2002; 18(9): 399-405.

- Oliveira AG, Galati EAB, Oliveira O, Oliveira GRO, Espindola AR, Dorval MEC, et al. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(8): 869-874.
- Oliveira JM, Fernandes AC, Dorval MEC, Alves TP, Fernandes TP, Oshiro ET, et al. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43(2):188–193.
- Oliveira EF, Oshiro ET, Fernandes WS, Ferreira AMT, Oliveira AG, Galati EAB. Vector competence of *Lutzomyia cruzi* naturally demonstrated for *Leishmania infantum* and suspected for *Leishmania amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg* 2017a; 96(1):178-181.
- Oliveira EF, Oshiro ET, Fernandes WS, Murta PG, Medeiros MJ, Souza, AI, et al. Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. *Plos Negl Trop Dis* 2017b;11(2), e0005401. doi:10.1371/journal.pntd.0005401.
- Otranto D, Paradies P, Caprariis S, Stanneck D, Testini G, Grimm F, et al. Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16(3):337-343.
- Paranhos-Silva M, Freitas LAR, Santos WC, Grimaldi Jr-G, Pontes-De-Carvalho LC, Oliveira-Dos-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55(1):39-44.
- Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernardina W, Del Real G, Ruitenberg J. Cellular and immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 1994; 62(1):229-235.
- Peixoto, HM, Oliveira, MRF, Romero, GAS. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systemic review and meta-analysis. *Trop Med Int Health* 2015; 20(3):334-352.
- Prefeitura Municipal de Campo Grande. Secretaria Municipal de Saúde Pública. Diretoria de vigilância em saúde. Coordenadoria de Controle em Zoonoses. Serviço de Controle de Raiva e outras Zoonoses. *Relatório anual*. Campo Grande, MS, 2012.
- 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. *Parasitol* 2001; 122(3):253-261.
- Quinnell RJ, Carson C, Reithinger R, Garcez LM, Courtney O. Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. *Plos Negl Trop Dis* 2013;7(1): e1992. doi: 10.1371/journal.pntd.0001992.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>, 2017.

Schoojans F, Zalata A, Depuydt CE, Comhaire FH. Med Calc: a new computer program for medical statistics. *Comput Methods Programs in Biomed* 1995; 48(3):257-262.

Schriefer ALF, Sousa RS, Guimarães LH, Goés-Neto A, Schriefer A. Papel do parasita e do hospedeiro na expressão clínica das leishmanioses. *GM Bahia* 2005; 75(1):46-56.

Silva KR, Mendonça VRR, Silva KM, Nascimento LFM, Mendes-Sousa AF, de Pinho FA, et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endêmica area in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2017; 112(1):53-62.

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2009; 165(1-2):1-18.

Soto M, Corvo L, Garde E, Ramírez L, Iniesta V, Bonay P, et al. Co-administration of the three antigenic *Leishmania infantum* poly (A) binding proteins as a DNA vaccine induces protection against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Plos Negl Trop Dis* 2015; 9(5):1-24.

Waner CK, Dawson JE. Genus and Species-level identification of *Ehrlichia* species by PCR and sequencing. In: PERSING, D. H (Ed.). *PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases. A supplement to Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. ASM Press. Washington, 1996, p. 100- 105.

World Health Organization. *Disease Watch Focus: Leishmaniasis*. 2007 In: TDR | Nature Reviews Microbiology. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/disease_watch/leish/en/>. Acesso em 20 de maio de 2016

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina deve ser aprimorado, buscando métodos mais sensíveis e específicos a fim de reduzir a eutanásia de cães falso-positivos; bem como deve-se evitar a manutenção de animais falso-negativos no ambiente, a qual perpetua o ciclo epidemiológico da doença. Sugere-se a investigação dos antígenos HSP70 e LiP2a, utilizados de forma combinada no ELISA, para averiguar o potencial destas proteínas antigênicas em minimizar essas deficiências. Ademais, é importante reforçar que a resposta dos cães aos testes sorológicos ELISA e TR-DPP®, assim como suas manifestações clínicas, diferem de acordo com a situação epidemiológica da região de onde provém. Sendo assim, recomenda-se que o desenvolvimento de qualquer novo exame sorológico diagnóstico para LVC seja submetido à avaliação em populações com prevalências distintas para leishmaniose visceral e com perfis clínicos diferenciados, de modo a representar veridicamente o cenário nacional no qual será aplicado.

8. ANEXOS

Anexo I: Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA/ UFMS para as amostras provenientes de animais de Camapuã/MS.

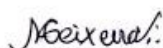


Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 645/2014 da Pesquisadora **Alessandra Gutierrez de Oliveira**, referente ao projeto de pesquisa "Leishmaniose Visceral Americana, estudo da prevalência canina e identificação de *Leishmania spp.* no município de Camapuã/MS", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 15 de dezembro de 2014.


Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 15 de dezembro de 2014.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.2000@gmail.com
fone (67) 3345-7186

Anexo II: Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA/ UFMS para as amostras provenientes de animais de Campo Grande/MS.



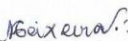
Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto intitulado "Diferentes abordagens diagnósticas de Leishmaniose Visceral Canina em área endêmica", Protocolo nº 697/2015 sob a responsabilidade de **Alessandra Gutierrez de Oliveira** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, em reunião ordinária do dia 12 de agosto de 2015.

Vigência do Projeto	01/09/2015 a 01/12/2017
Espécie/Linhagem ou Raça	<i>Canis lupus familiaris</i> / Sem Raça Definida (SRD)
Números de Animais	200
Peso/Idade	Diversos/Variáveis
Sexo	Macho e Fêmea
Origem (fornecedor)	Hospital Veterinário da FAMEZ/UFMS e Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande/MS


Maria Araújo Teixeira

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 13 de agosto de 2015.

Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação- PROPP
Cidade Universitária, s/n | Caixa Postal 549
Fone: 67 3345.7186 E-mail: gab.propp@ufms.br
CEP 79070-900 | Campo Grande | MS

Anexo III: Termo de consentimento livre esclarecido para as amostras provenientes de animais de Camapuã/MS.

TERMO DE CONSENTIMENTO			
Título do projeto: Leishmaniose Visceral Americana: prevalência canina e identificação de <i>Leishmania spp.</i> em Camapuã/MS.			
Nome do pesquisador principal: Leandro Machado Borges			
Razão social e CIAEP instituição da CEUA que aprovou: Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CIAEP 01.0016.2013. Aprovação CEUA/UFMS pelo protocolo 645/2014			
Objetivos do estudo: Reconhecer a situação epidemiológica da leishmaniose visceral americana no município de Camapuã/MS e identificação da espécie de <i>Leishmania</i> circulante nos cães soropositivos.			
Procedimentos a serem realizados com os animais: será realizada uma única visita para coletas de sangue venoso e punção de linfonodo através da aspiração por agulha fina, durante a realização do inquérito amostral. Os animais reagentes para Leishmaniose serão posteriormente eutanasiados e necropsiados para obtenção de materiais biológicos para o presente estudo. O cadáver do animal será enterrado em vala profunda com uma camada de cal virgem.			
Potenciais riscos para os animais: flebite pós coleta venosa.			
Cronograma: Inquérito canino sorológico amostral, teste rápido DPP* e necropsias (julho e agosto de 2015), realização de exames nas amostras caninas pela técnica PCR e Elisa (julho, agosto, setembro de 2015).			
Benefícios: o presente trabalho se faz necessário para o reconhecimento de dados epidemiológicos importantes que auxiliam na vigilância e controle da leishmaniose visceral canina, a fim de proporcionar medidas preventivas eficazes em relação à leishmaniose visceral em humanos.			
Esclarecimentos ao proprietário sobre a participação do animal neste projeto: o animal foi selecionado por amostragem para participar do presente projeto, onde será realizada a coleta de sangue de cães em todos os setores urbanos do município para reconhecer qual setor merece maior atenção do poder público para controlar a Leishmaniose Visceral Americana através de atividades de prevenção.			
Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s).			
A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada.			
Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.			
O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será o(a) Dr. Leandro Machado Borges, inscrito(a) no CRMV/MS sob o n.º 3.795. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal, Dra. Eliane Mattos Piranda, Dra. Alessandra Gutierrez de Oliveira e Dra. Natália Fontoura, também se responsabilizará pelo bem estar do(s) seu(s) animal(is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos:			
Tel. de emergência: (67)9935-0042			
Equipe: Leandro Machado Borges, Eliane Mattos Piranda, Alessandra Gutierrez de Oliveira, Natália Fontoura.			
Endereço: Rua Antônio Inácio Barbosa, s/n.º, Vila Diamantina, CEP: 79.420-000, Camapuã/MS.			
Telefone : (67)3286-1332			
Declaração de consentimento			
Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.			
Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.			
Camapuã/MS, _____ de _____ de 2015.			
Assinatura do Responsável		Assinatura do Pesquisador Responsável	
Nome: _____		Documento de Identidade: _____	
Identificação do(s) animal(is)			
Nome:	Nome:	Nome:	Nome:
Nº id:	Nº id:	Nº id:	Nº id:
Espécie:	Espécie:	Espécie:	Espécie:
Raça:	Raça:	Raça:	Raça:
Nome:	Nome:	Nome:	Nome:
Nº id:	Nº id:	Nº id:	Nº id:
Espécie:	Espécie:	Espécie:	Espécie:
Raça:	Raça:	Raça:	Raça:

Anexo IV: Termo de consentimento livre esclarecido para as amostras provenientes de animais de Campo Grande/MS.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Título do projeto: Diferentes abordagens diagnósticas de Leishmaniose Visceral Canina em área endêmica

Nome do pesquisador principal: Alessandra Gutierrez de Oliveira

Razão social e CIAEP instituição da CEUA que aprovou: 697/2015

Objetivos do estudo:

- Caracterizar os cães susceptíveis a *Leishmania* spp. de acordo com escores clínicos;
- Associar o perfil clínico dos animais susceptíveis à *Leishmania* spp. e o diagnóstico parasitológico;
- Verificar a associação do perfil clínico do animal e a exposição a estímulo prévio vacinal para *Leishmania* spp.;
- Diagnosticar parasitologicamente cães com *Leishmania* spp.;
- Avaliar a resposta imunológica de cães com *Leishmania* spp através de teste rápido e antígenos recombinantes;
- Identificar a espécie de *Leishmania* spp. por análise molecular;
- Identificar a presença de outros hemoparasitas.

Procedimentos a serem realizados com os animais: No momento da consulta pelo médico veterinário, serão realizados exame clínico do(s) animal(is) e coleta de uma única amostra de sangue periférico (10ml) através de venopunção e de uma amostra de linfonodo através da punção com agulha fina do animal. Serão realizados testes imunológicos (DDP® e ELISA) para o diagnóstico de hemoparasitas.

Potenciais riscos para os animais: estresse devido à contenção rotineira durante a consulta e coleta das amostras.

Cronograma: As coletas serão realizadas em uma única vez quando o proprietário levar seu(s) animal(is) para consulta pelo médico veterinário no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul ou em atendimento particular, durante a realização do projeto de 01/09/2015 a 01/12/2017

Benefícios: O proprietário do(s) animal(is) participante(s) do estudo terá acesso aos resultados dos exames realizados em seu(s) cão(es). Além disso, a presente pesquisa permitirá avanços no diagnóstico da leishmaniose visceral canina e possíveis reações cruzadas.

Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s). A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares. O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será o(a) Dr(a) Nathália Lopes Fontoura Mateus, inscrito(a) no CRMV sob o nº 5552/MS. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal Alessandra Gutierrez de Oliveira também se responsabilizará pelo bem-estar do(s) seu(s) animal(is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos: Tel. de emergência: 9984-5012 Equipe: Parasitologia Humana Endereço: Laboratório de Parasitologia, CCBS/UFMS, Cidade Universitária, s/n, 79070-900, Campo Grande/MS. Telefone: 3345-7369

Declaração de consentimento: Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Campo Grande, / /

Assinatura do Responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável

Nome do Responsável:

Documento de Identidade:

Identificação do(s) animal(is):

Nome:	Nome:
Número de identificação:	Número de identificação:
Espécie:	Espécie:
Raça:	Raça:

Nome:	Nome:
Número de identificação:	Número de identificação:
Espécie:	Espécie:
Raça:	Raça:

Anexo V: Ficha de avaliação clínica adaptada de Silva et al. (2017).

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA (LVC)

DATA: _____ IDENTIFICAÇÃO/ CHIP: _____ SEXO: _____

RAÇA: _____ PESO: _____ TIPO DE PELO: _____ COLORAÇÃO DO PELO: _____

ESTADO GERAL: ATIVO () APÁTICO () ECTOPARASITAS: PULGAS (); CARRAPATOS (); OUTROS ()

PARÂMETROS CLÍNICOS	CLASSIFICAÇÃO			OBSERVAÇÕES
ESTADO NUTRICIONAL	NORMAL (0)	MAGRO (1)	CAQUETICO (2)	
PELAGEM	BOM-ÓTIMO (0)	REGULAR (1)	RUIM (2)	
UNHAS	NORMAIS (0)		AUMENTADAS (1)	
LINFONÓDOS	NORMAIS (0)		AUMENTADO 1 PAR (1) AUMENTADO MAIS DE 1 PAR (2)	
COLORAÇÃO DAS MUCOSAS	NORMAIS (0)		PÁLIDAS (1) CONGESTAS (2)	
LESÃO DE FOCINHO	AUSENTE (0)		PRESENTE (1) ÚLCERAS (2)	
DESPIGMENTAÇÃO DO FOCINHO	AUSENTE (0)		PRESENTE (1)	
LESÃO NO LÁBIO	AUSENTE (0)		PRESENTE (1) ÚLCERAS (2)	
DESPIGMENTAÇÃO DO LÁBIO	AUSENTE (0)		PRESENTE (1)	
LESÃO PONTA DE ORELHA	AUSENTE (0)		PRESENTE (1) ÚLCERAS (2)	
DERMATITE ESFOLIATIVA	AUSENTE (0)		PRESENTE LOCALIZADA (1) PRESENTE GENERALIZADA (2)	
SECREÇÃO OCULAR	AUSENTE (0)	SEROSA-MUCOSA (1)	MUCO PURULENTO (2)	
ÁREAS DE ALOPECIA	AUSENTE (0)		PRESENTE 1 ÁREA (1) PRESENTE MAIS DE 1 ÁREA GENERALIZADA (2)	
BLEFARITE	AUSENTE (0)		PRESENTE (1)	
SANGRAMENTO	AUSENTE (0)		PRESENTE (1)	
TOTAL DE PONTOS				

Anexo VI: Normas da Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Os artigos aqui apresentados foram formatados de acordo com as normas vigentes da Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, como descrito a seguir.

APRESENTAÇÃO DOS MANUSCRITOS

Na elaboração do texto serão observadas as seguintes normas:

Os trabalhos devem ser submetidos em inglês, de forma concisa, com linguagem impessoal com os sinais de chamadas de rodapé em números arábicos, lançados ao pé da página em que estiver o respectivo número e em ordem crescente. Os trabalhos deverão ser apresentados em fonte "Times New Roman", tamanho 12, com margem superior e inferior de 2,5 cm, esquerda e direita com 3 cm e espaçamento entre linhas de 1,5 cm com as páginas numeradas. Para a categoria Artigo Completo, o trabalho não deverá exceder 17 páginas, quando da diagramação final. Para a categoria Comunicação Breve, o trabalho não deverá exceder 6 páginas, quando da diagramação final. As tabelas e ilustrações deverão ser apresentadas separadas do texto e anexadas ao final do trabalho, sem legendas. As respectivas legendas deverão vir no texto logo após as referências bibliográficas. Os trabalhos submetidos deverão ser revisados por um dos revisores de língua inglesa credenciados pela RBPV, de escolha e sob responsabilidade dos autores. Os Artigos Completos devem ser organizados obedecendo à seguinte sequência: Título Original, Título Traduzido, Autor(es), Filiação Institucional, Abstract (Keywords), Resumo (Palavras-chave), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões (ou combinação destes três últimos), Agradecimentos (facultativo) e Referências Bibliográficas. As Comunicação Breve obedecem à sequência acima sem a necessidade de se destacar os tópicos, sendo escritas em texto corrido. Para essa categoria, o artigo submetido só será aceito desde que possua alto grau de ineditismo e originalidade, trazendo resultados novos de importância evidente, atribuindo ao Editor-chefe a continuidade da submissão ou não.

Características dos elementos de um trabalho científico

Título Original

O título "cheio" e o subtítulo (se houver) não devem exceder 18 palavras. Não deverá aparecer nenhuma abreviatura, e os nomes de espécies ou palavras em latim deverão vir em itálico. Evitar (por exemplo) títulos que iniciem com: Estudos preliminares; Observações sobre. Não usar o nome do autor e data de citação em nomes científicos.

Autor(es)/Filiação

Na identificação, deve constar: nome completo e por extenso de todos os autores (sem abreviação). A Filiação Institucional deve informar os nomes próprios de todas as instituições e não suas traduções: Laboratório, Departamento, Faculdade ou Escola, Instituto, Universidade, Cidade, Estado e País, exatamente nessa ordem. No rodapé, deve constar as informações do autor para correspondência: Endereço completo, telefone e e-mail atualizado, nessa ordem.

Referências bibliográficas

As referências bibliográficas só serão admitidas desde que sejam de fácil consulta aos leitores. Não serão aceitas referências de trabalhos publicados em anais de congressos e as teses devem estar disponíveis para consulta em sites oficiais, por exemplo, Banco de Teses da Capes: <http://www.capes.gov.br/servicos/banco-de-teses>. Todas as citações no texto devem ser

cuidadosamente checadas em relação aos nomes dos autores e datas, exatamente como aparecem nas referências.

“Abstract” e Resumo

Devem conter no máximo 200 palavras, em um só parágrafo sem deslocamento. Não devem conter citações bibliográficas. Siglas e abreviações de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso, por exemplo, Indirect Fluorescence Assay (IFA). Devem ser informativos, apresentando o objetivo do trabalho, metodologia sucinta, os resultados mais relevantes e a conclusão. O abstract redigido em língua inglesa e o resumo em língua portuguesa, ambos seguidos por keywords e palavras-chave, respectivamente.

Keywords e Palavras-chave

As palavras-chave devem expressar com precisão o conteúdo do trabalho. São limitadas em no máximo 6 (seis).

Introdução

Explicação clara e objetiva do estudo, da qual devem constar a relevância e objetivos do trabalho, restringindo as citações ao necessário.

Material e Métodos

Descrição concisa, sem omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser apenas citados e referenciados. Métodos estatísticos devem ser explicados ao final dessa seção.

Resultados

O conteúdo deve ser informativo e não interpretativo: sempre que necessário devem ser acompanhados de tabelas, figuras ou outras ilustrações autoexplicativas.

Discussão

Deve ser limitada aos resultados obtidos no trabalho e o conteúdo deve ser interpretativo. Poderá ser apresentada como um elemento do texto ou juntamente aos resultados e conclusão. Enfatizar a importância de novos achados e novas hipóteses identificadas claramente com os resultados.

Tabelas

Elaboradas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e no final; e devem ser enviadas em formato editável (desejável excel). A legenda (título) é precedida da palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismos arábicos, devendo ser descritivas, concisas e inseridas acima das mesmas. As tabelas devem estar limitadas a um número mínimo necessário. Devem ser digitadas em espaço duplo em arquivos separados.

Figuras

As figuras, tais como: desenho, fotografia, prancha, gráfico, fluxograma e esquema, devem ser enviadas em formato .tif, .gif ou .jpg, com no mínimo de 300 dpi de resolução e numeradas consecutivamente. As legendas devem ser precedidas da palavra Figura, seguida da numeração em algarismo arábico e inseridas abaixo das mesmas. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções, em folha separada em espaço duplo. O número de ilustrações deve ser restrito ao mínimo necessário. Fotografias digitais deverão ser enviadas em arquivos separados, como foram obtidas. Se a escala for dada às figuras, utilizar a escala BAR em todas as ilustrações ao invés de numérica, que pode ser alterada com a redução das figuras.

Conclusões

As conclusões podem estar inseridas na discussão ou em resultados e discussão, conforme a escolha dos autores. Nesse caso, esse item não será necessário.

Agradecimentos

Quando necessário, limitados ao indispensável.

Referências bibliográficas

A lista de referências deverá ser apresentada em ordem alfabética e, posteriormente, ordenadas em ordem cronológica, se necessário. Mais de uma referência do(s) mesmo(s) autor(es) no mesmo ano deve ser identificada pelas letras "a", "b", "c", etc, inseridas após o ano de publicação. Títulos de periódicos devem ser abreviados conforme Index Medicus - <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>.

Livros

Levine JD. Veterinary protozoology. Ames: ISU Press; 1985.

Capítulo de livro

Menzies PI. Abortion in sheep: diagnosis and control. In: Youngquist RS, Threlfall WR. Current therapy in large animal theriogenology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2007. p. 667- 680.

Artigo de periódico

Paim F, Souza AP, Bellato V, Sartor AA. Selective control of Rhipicephalus (Boophilus) microplus in fipronil-treated cattle raised on natural pastures in Lages, State of Santa Catarina, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 2011; 20(1): 13-16.

Tese e Dissertação

Araujo MM. Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do município de patos, Paraíba - Brasil [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2002.

Documento eletrônico

Centers for Disease Control and Prevention. Epi Info [online]. 2002 [cited 2003 Jan 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>.

Obs. Nas referências, apresentar os nomes dos seis primeiros autores; para referências com mais de seis autores, apresentar os seis primeiros nomes seguidos da expressão et al.

Citações

As citações devem seguir o sistema autor-data:

Um autor: nome do autor e ano de publicação Levine (1985) ou (LEVINE, 1985)

Dois autores: os nomes dos autores e ano da publicação Paim e Souza (2011) ou (PAIM & SOUZA, 2011)

Três ou mais autores: nome do primeiro autor seguido de "et al." e o ano de publicação Araújo et al. (2002) ou (ARAÚJO et al., 2002)