



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



Programa de Pós-Graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Desempenho do teste imunocromatográfico rápido DPP® - *Dual Path Platform* para diagnóstico da leishmaniose visceral canina e reação cruzada com hemoparasitos

Camila Oliveira Silva Barbosa

Uberlândia - MG

Julho – 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



Programa de Pós-Graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Desempenho do teste imunocromatográfico rápido DPP® - *Dual Path Platform* para diagnóstico da leishmaniose visceral canina e reação cruzada com hemoparasitos

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial a obtenção do título de Mestre

Aluna: Camila Oliveira Silva Barbosa

Orientador: Sydnei Magno da Silva

Uberlândia – MG

Julho – 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

S586d      Barbosa, Camila Oliveira Silva  
2015      Desempenho do teste imunocromatográfico rápido DPP® - Dual  
Path Platform para diagnóstico da leishmaniose visceral canina e reação  
cruzada com hemoparasitos / Camila Oliveira Barbosa. - 2015.  
69 f. : il.

Orientador: Sydnei Magno da Silva.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Leishmaniose visceral - Teses. 3. Cão -  
Doenças - Teses. 4. Leishmania infantum - Teses. I. Silva, Sydnei  
Magno da. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-  
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



**Camila Oliveira Silva Barbosa**

“Desempenho do teste imunocromatográfico rápido DPP® – Dual Path Platform para diagnóstico da leishmaniose visceral canina e reação cruzada com hemoparasitos”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 29 de julho de 2015.

Profa. Dra. Renata Cristina de Paula – UFMG

Profa. Dra. Márcia Cristina Cury – ICBIM/UFU

Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva – ICBIM/UFU (orientador)

*Aos meus pais*

*Edson e Ivânia pelo amor, apoio e incentivo*

*As minhas irmãs*

*Dayane e Franciele, pelo incentivo e carinho*

*Ao meu esposo*

*Daniel pelo apoio, amor, dedicação e principalmente pelo companheirismo*

*Aos meus filhos de quatro patas*

*Vida, Teca, Ted e Jack, pela alegria*

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem”

Guimarães Rosa

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças, para enfrentar todos os obstáculos durante esses dois anos de caminhada e por não me deixar desistir de alcançar meus objetivos.

Aos meus queridos pais, obrigada por tudo que sempre fizeram e ainda fazem por mim, sou imensamente grata. Obrigada por sempre apoiarem minhas decisões, mesmo quando vocês acham que não é o melhor para mim. Obrigada pelo amor, carinho, colo, palavras de incentivo, paciência. Vocês são a minha fortaleza. Amo muito vocês!

Às minhas irmãs Dayane e Franciele, obrigada pelo apoio, carinho e por torcerem sempre para meu sucesso.

Ao meu esposo Daniel, obrigada pelo amor, companheirismo, apoio e incentivos diários. Sem o seu apoio eu não teria conseguido concluir mais essa etapa da minha vida. Você foi fundamental em todas as etapas deste processo. Obrigada por me incentivar e não me deixar desistir, várias vezes pensei em desistir e graças a você e ao seu apoio, consegui. Te amo!

À minha amiga Elivaine Freitas que me ajudou muito no início do mestrado, que me apoiou e esclareceu minhas dúvidas e que sempre tinha uma palavra amiga para me incentivar. Obrigada por tudo que fez por mim, graças a você eu comecei a fazer o mestrado.

Às minhas colegas de laboratório que se tornaram minhas amigas, as suicidas: Marcela Porta, Karen Ferraz, Kelem Mota, Júlia Rodrigues, Juliana Miranda, Natália Melo e Letícia Pereira. Obrigada por todo apoio, carinho e palavras amigas. Com vocês tudo ficou melhor e torno-se mais fácil. Obrigada por todos os momentos de descontração que tivemos, pelas risadas e momentos felizes que foram muitos, pelas festinhas, reuniões, aniversários surpresas e principalmente pelo companheirismo e por toda ajuda ao longo desses dois anos. Gosto muito de todas vocês e espero conviver com vocês por muito tempo.

Marcela Porta, obrigada por toda ajuda nos experimentos, no projeto e principalmente por se tornar minha amiga. Obrigada por tudo que fez por mim, pelas palavras de apoio e de carinho e por sempre me consolar quando eu mais precisava. Gosto muito de você e espero que sejamos sempre amigas.

Karen Ferraz, obrigada por toda a sua ajuda nos experimentos e na escrita da minha dissertação. Não sei nem como te agradecer por tudo que fez por mim e sempre que precisar pode contar com minha ajuda.

Kelem Maria, obrigada por seu apoio e palavra amiga sempre que precisei. Obrigada pela ajuda no meu projeto de doutorado e na minha dissertação, a sua ajuda foi muito especial.

Júlia Rodrigues, obrigada por todo apoio e pela na ajuda no meu projeto de doutorado, sua ajuda foi muito importante e fundamental no desenvolvimento do meu projeto. Obrigada pela disposição em sempre me ajudar e por sempre ter uma palavra amiga.

Juliana Miranda, obrigada por toda ajuda nos experimentos e por sempre me auxiliar e me ensinar. Você sempre muito disposta ajudar.

Dali, Naty e Lets, obrigada pelos incentivos diários e por sempre terem uma palavra amiga nos momentos em que mais precisei e obrigada por sempre estarem dispostas a ajudar.

Ao meu orientador Profº Drº Sydnei Magno da Silva, obrigada por me aceitar como aluna mesmo quando eu disse que nunca tinha entrado em um laboratório de pesquisa e principalmente por acreditar no meu potencial. Obrigada pela paciência que você teve em me ensinar e auxiliar no meu aprendizado ao longo desses dois anos. Aprendi muitas coisas com você e sou muito grata por isso.

À Profª Drª Márcia Cristina Cury, obrigada por abrir as portas do laboratório para nosso grupo. Obrigada por ter me acolhido de braços abertos e por ter me dado apoio nos momentos difíceis. Obrigada pelas palhaçadas e risadas e principalmente

por acreditar em mim e no meu trabalho e me aceitar como sua futura aluna de doutorado.

Obrigada a todos que de alguma forma me apoiaram e me motivaram a continuar.

À banca examinadora por se dispor a corrigir o meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## **Lista de Abreviaturas**

CETEA: Comitê de Ética na Experimentação Animal

CEUA: Comissão de Ética na Utilização de Animais

DPP®: *Dual Path Platform*

ELISA: *Enzyme lynked immunosorbent assay*

EMC: Erliquiose monocítica canina

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

ICBIM: Instituto de Ciências Biomédicas

IgG: Imunoglobulina de classe G

LC: Leishmaniose cutânea

LCD: Leishmaniose cutâneo difusa ou anérgica

LCM: Leishmaniose cutâneo mucosa

LPG: Lipofosfoglicano

LTA: Leishmaniose tegumentar americana

LT: Leishmaniose tegumentar

LV: Leishmaniose visceral

MG: Minas Gerais

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPD: *Orthophenylenediamine*

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

PCR: Reação em cadeia de polimerase

RDT: *Kalazar Detect Canine Rapid Test*

RIFI: Reação de imunofluorescência indireta

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SMF: Sistema monocítico mononuclear fagocitário

UFU: Universidade Federal de Uberlândia

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

VPN: Valor preditivo negativo

VPP: Valor preditivo positivo

## Lista de Figuras e Quadros

**Quadro 1:** Quadro 1 - Estágios da leishmaniose visceral canina, baseado em testes sorológicos, exame físico, alterações laboratoriais e prognóstico, proposto por Solano-Gallego et al. (2009) pág. 25

**Figura 1:** Dispositivo DPP® Dual Path Platform – Bio-Manguinhos pág.39

**Figura 2:** Imagem ilustrativa do dispositivo DPP® Dual Path. (A) DPP® com resultado positivo; (B) DPP® com resultado negativo pág. 45

**Figura 3:** Recíproca dos títulos da RIFI em soros de 60 cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum* provenientes da cidade de Ribeirão das Neves (MG) em relação aos diferentes estágios clínicos da leishmaniose visceral canina proposto por Solano-Gallego et al. (2009), adaptado por Silva et al. (2012).: (\_\_\_\_) Mediana; \*\*\*p<0,0001; #p<0,05" pág. 47

**Figura 4:** Absorbância determinada pelo teste de ELISA em soros de 60 cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum* provenientes da cidade de Ribeirão pág.48

**Figura 5:** Correlação entre os resultados dos testes de ELISA e RIFI determinados em soros de 60 cães por *Leishmania (L.) infantum* provenientes da cidade de Ribeirão das Neves (MG) pág. 49

## Lista de tabelas

**Tabela 1:** Classificação da leishmaniose visceral canina em estágios clínicos proposta por Solano-Gallego et al. (2009) e adaptado por Silva et al. (2007)

pág.37

**Tabela 2:** Desempenho do DPP® Dual Path Platform (Biomanguinhos/Fiocruz, Brasil) em amostras soros de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum* classificados de acordo com estágios clínicos da leishmaniose visceral canina\*

pág. 46

**Tabela 3:** Freqüência de positividade do DPP® Dual Path Platform, RIFI *in-house* e ELISA *in-house* em soro de cães infectados com hemoparasitos

pág. 49

**Tabela 4:** Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia para DPP® Dual Path Platform (Biomanguinhos/Fiocruz, Brasil), ELISA e RIFI (VPN) e acurácia para DPP® Dual Path Platform (Biomanguinhos/Fiocruz, Brasil), ELISA e RIFI

pág. 50

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b>	14
<b>Abstract</b>	15
<b>1 Introdução</b>	16
1.1 Leishmanioses	16
1.2 Ciclo Biológico	18
1.3 Leishmaniose visceral no Brasil	18
1.4 Leishmaniose visceral canina	20
1.5 Diagnóstico da leishmaniose visceral canina	26
1.6 Hemoparasitos mais encontrados em cães	29
<b>2 Justificativa</b>	33
<b>3 Objetivos</b>	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
<b>4 Material e Métodos</b>	35
4.1 Animais	35
4.2 Amostras de soro	35
4.2.1 Soros de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i>	35
4.2.2 Soros de cães não infectados	38
4.2.3 Soros de cães infectados com hemoparasitos	38
4.3 Testes Sorológicos	39
4.3.1 DPP® Dual Path Platform	39
4.3.2 Reação de Imunofluorescência indireta – RIFI	40
4.3.3 Ensaio imunoenzimático - ELISA	41
<b>5 Análise Estatística</b>	43
<b>6 Resultados</b>	45
6.1 DPP® Dual Path Platform	45
6.2 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	46
6.3 ELISA	47
6.4 Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia	50
<b>7 Discussão</b>	51

<b>8 Conclusões</b>	59
<b>Referências Bibliográficas</b>	60
<b>Anexos</b>	68
<b>Anexo 1</b>	68
<b>Anexo 2</b>	69

## Resumo

No Brasil, a leishmaniose visceral é uma zoonose causada por *L. infantum*, transmitida por *Lutzomyia longipalpis*, e o cão doméstico é o principal reservatório do parasita. A doença no cão, leishmaniose visceral canina, apresenta altas taxas de prevalência, principalmente em áreas endêmicas e precede a doença em humanos. Umas das formas de controle da doença adotadas pelo governo brasileiro como parte do “Programa de Controle da Leishmaniose Visceral” é a eliminação dos animais soropositivos para *Leishmania*. O diagnóstico realizado pelo programa de controle é o teste imunocromatográfico rápido DPP® *Dual Path Platform* como triagem e o ensaio imunoenzimático (ELISA) como confirmatório. Neste estudo, o desempenho do DPP® foi avaliado para o diagnóstico da LVC e comparado com ELISA e ensaio de imunofluorescência indireta (RIFI), os dois últimos realizados com antígenos brutos de *L. infantum*. A especificidade do DPP® foi avaliada com 74 amostras de soros de cães não infectados de área não-endêmica para LVC. Amostras de soros de 60 cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* com diagnóstico parasitológico positivo (exame direto e PCR específico em aspirado de medula óssea) foram utilizados para avaliar a sensibilidade. O DPP® apresentou melhor especificidade (98,33%) quando comparado ao ELISA (90,0%) e RIFI (96,67%). A sensibilidade do DPP® foi menor (93,33%) em relação ao encontrado no ELISA (100%) e na RIFI (98,33%). O DPP® apresentou resultados de VPP (98,24%), VPN (96,72%) e acurácia (96,66%). Neste estudo, também foi avaliado o desempenho dos testes sorológicos, DPP®, ELISA e RIFI, em amostras de soros de cães infectados com hemoparasitos para identificar se os testes apresentariam reação cruzada. Foram utilizados, 46 soros de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* e *Mycoplasma haemocanis*. Apenas uma amostra de soro de cão co-infectado com *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* foi positivo no DPP®. No ELISA, oito amostras de soros foram positivas; seis com *Ehrlichia canis* e duas com *Hepatozoon canis*. Quando comparado com RIFI e ELISA, DPP® demonstrou bom desempenho no diagnóstico, o que o qualifica como um teste aplicável para o diagnóstico sorológico da LVC.

Palavras-chave: DPP® - Dual Path Platform, ELISA, *Leishmania infantum*, leishmaniose visceral, leishmaniose visceral canina, RIFI

## Abstract

The immunochromatographic rapid test based on dual-path platform (Dual Path Platform – DPP®) is the official screening serological test for canine visceral leishmaniasis (CVL) used by the Ministry of Health as part of the Brazilian visceral leishmaniasis control program. In this study the performance of DPP® test was assessed for the diagnosis of CVL and compared with an immunoenzymatic assay (ELISA) and an indirect immunofluorescence assay (IFA) which used *L. infantum* crude antigens. The specificity of DPP® was evaluated using serum samples collected from unexposed dogs from non-endemic area (n=74) and from dogs infected with hemoparasites (*Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Mycoplasma haemocanis* and *Anaplasma platys*) (n=46). Sixty serum samples from *Leishmania infantum* naturally infected dogs with parasitological diagnosis confirmed (cytological examinations and specific PCR of bone marrow aspirates) were used to evaluate the sensitivity. The DPP® showed higher specificity [DPP®: 98.33%; ELISA: 90.0%; IFA: 96.67%] and lower sensitivity [(DPP®: 93.33%; ELISA: 100%; IFA: 98.33%)] than the traditional serological assays. When compared to IFA and ELISA, DPP® showed good diagnostic performance which qualifies it as a reliable serological test for CVL diagnosis. Despite of its feasibility, the higher specificity of DPP® suggests that this test should be used as a confirmatory instead a screening tool in VL control programs. Furthermore, when used as confirmatory test DPP® could diminishes the rates of culling false-positives dogs.

**Keywords:** Canine visceral leishmaniasis, DPP® - Dual Path Platform, *Leishmania infantum*, serology/diagnosis, ELISA, IFA

## 1 Introdução

### 1.1 Leishmanioses

As leishmanioses representam grave problema de saúde pública, e cerca de 350 milhões de pessoas em 88 países estão sujeitas a infecção, com estimativa anual de dois milhões de novos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; WHO, 2010). Destes, 500.000 pessoas são tomadas pela forma visceral (LV) e 1,0 a 1,5 milhões pelas formas tegumentares (LT) da doença (ALVAR et al., 2006; WHO, 2010). Cerca de 90% dos casos de LV ocorrem em Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (DESJEUX, 2004; WHO, 2010), enquanto que Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria são responsáveis pela notificação de 90% dos casos de LT (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae, com ciclo intracelular obrigatório nas células do sistema monocítico mononuclear fagocitário (SMF). Possui duas formas evolutivas principais: uma flagelada, denominada promastigota, encontrada no tubo digestório do inseto vetor, e outra sem flagelo aparente, a forma amastigota, observada nas células do SMF presentes nos tecidos dos hospedeiros mamíferos (BATES, 2007).

*Leishmania* foi primeiramente descrita em 1903, através de biópsias de pele e de tecido do baço em doentes na Índia por dois pesquisadores, Leishman e Donovan, respectivamente (HERWANDT, 1999). Ross, nesse mesmo ano, criou o gênero *Leishmania*, denominando *Leishmania donovani*, o agente etiológico do calazar (WHO, 2010).

Os hospedeiros invertebrados de *Leishmania* são flebótomos (Díptera: Psychodidae; subfamília Phlebotominae) dos gêneros *Phlebotomus* (transmissão do parasito no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (LAINSON; SHAW, 2005). Essas espécies de flebotomíneos são largamente encontradas na natureza (SHAW, 2002). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2010), foram descritas aproximadamente 500 espécies de flebótomos, mas apenas 30 espécies são responsáveis pela transmissão dos parasitos causadores das leishmanioses.

A LV é a forma mais grave da doença podendo levar o indivíduo a morte se não tratada e diagnosticada precocemente, e é causada por duas espécies de *Leishmania*: *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*, (LAINSON; SHAW, 2005; MAURICIO

et al., 2001; WHO, 2010). Possui distribuição mundial, e nas Américas é denominada de leishmaniose visceral americana ou calazar neo-tropical (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Nas Américas a LV é uma zoonose, e os membros da família Canidae são os principais reservatórios do parasito. Entre os canídeos, o cão doméstico é considerado como reservatório mais importante da LV (ROMERO; BOELAERT, 2010).

Os principais sinais e sintomas da doença são: perda de peso, anemia, tosse, hepatomegalia, esplenomegalia, diarréias, surtos de febre, linfodenopatias, edemas e trombocitopenia (WHO, 2010). A doença compromete principalmente pacientes com estado imune debilitado como naqueles com HIV, câncer e sob uso de medicamentos imunossupressores. As crianças e os idosos também possuem mais chances de desenvolverem a doença (OLIVEIRA, et al., 2008).

Ocasionados por um conjunto de diferentes espécies de *Leishmania*, a LT pode apresentar distintas manifestações clínicas, de acordo com a espécie responsável pela moléstia. As formas tegumentares podem ser divididas em leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutâneo mucosa (LCM), leishmaniose cutâneo difusa ou anérgica (LCD) (CHAPPUIS et al., 2007; DESJEUX, 2004).

A LT está presente em vários países e nas Américas é denominada leishmaniose tegumentar americana (LTA), sendo encontrada desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (exceto no Chile e no Uruguai) (WHO, 2010).

A relação entre as classes sociais menos favorecidas e a doença é elevada. A pobreza está diretamente relacionada com o avanço dos casos de leishmanioses, devido a fatores que contribuem para o aumento do contato das pessoas com o vetor. Esses fatores incluem más condições de moradia e de saneamento básico (ALVAR et al., 2006; DESJEUX, 2004; WHO, 2010). Segundo a OMS (2010), a pobreza além aumentar o contato humano-vetor, contribui para a severidade da doença, uma vez que os indivíduos infectados já sofrem de outros distúrbios como anemia e desnutrição, o que agrava ainda mais o quadro das leishmanioses.

## 1.2 Ciclo Biológico

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida heteroxênico que envolve hospedeiro invertebrado, hospedeiro vertebrado, o parasito e, em alguns casos, um reservatório animal (WHO, 2010).

Possui duas formas evolutivas: amastigota intracelular obrigatória presente nas células do SMF dos hospedeiros vertebrados de forma ovalada se sem flagelo aparente e promastigota extracelular flagelada, encontrada no tubo digestório do vetor (BATES, 2007).

A transmissão do parasito ocorre quando fêmeas hematófagas de flebótomos (*Phlebotomus* - Velho Mundo e *Lutzomyia* - Novo Mundo), ao realizar repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, ingerem formas amastigotas presentes em macrófagos e monócitos juntamente com o sangue, linfa e restos celulares. A ingestão das formas amastigotas ocorre devido ao tipo de alimentação do flebotomíneo, denominada telmatofagia, que introduz suas peças bucais na pele do hospedeiro e dilacera o tecido (BATES, 2008). No intestino do inseto as amastigotas são transformadas em formas promastigotas procíclicas que possuem moléculas de um complexo lipofosfoglicano (LPG), considerada a mais abundante molécula de superfície encontrada nessa forma do parasito, que ao interagir com lectinas no intestino do vetor impede-as de serem eliminadas durante a digestão do alimento (OLIVIER et al., 2005; SOARES et al., 2005). As formas promastigotas procíclicas sofrem diversas multiplicações e são transformadas em promastigotas metacíclicas infectantes, que não sofrem divisão (OLIVIER et al. 2005; SOARES et al., 2005).

O ciclo de biológico do parasito se torna completo quando as formas promastigotas metacíclicas são liberadas junto com a saliva do inseto durante o repasto sanguíneo em um novo hospedeiro vertebrado suscetível (GONÇALVES et al., 2013).

## 1.3 Leishmaniose visceral no Brasil

No Brasil, a LV é uma zoonose causada por *L. infantum*, transmitida por *Lutzomyia longipalpis* e os principais reservatórios são membros da família Canidae,

sendo o cão doméstico o reservatório mais importante na LV zoonótica (LAINSON; SHAW, 2005; WHO, 2010).

Cerca de 90% dos casos de LV nas Américas ocorrem no Brasil e o país é considerado o maior em número de casos de LV zoonótica do mundo (ANDRADE et al., 2011). Possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrada nas regiões Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste. O primeiro relato de caso de LV no Brasil foi no ano de 1913, por Migone, ao realizar necropsia em um paciente do Estado de Mato Grosso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Inicialmente, a LV no Brasil era encontrada apenas na zona rural e atualmente há expansão da doença para as áreas urbanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), o Brasil no ano de 2013 registrou 3.253 casos confirmados de LV e os Estados que mais registraram foram: Maranhão, Ceará, Tocantins, Pará, Bahia e Minas Gerais com 282 casos (SINAN/SVS/MS, 2014). Atualmente 23 das 27 Unidades Federadas, apresentam casos autóctones (SINAN/SVS/MS, 2014).

O governo brasileiro criou no ano de 2003 o programa de controle da LV devido à grande incidência da doença no país e alta prevalência nos cães. Esse programa possui como medidas principais o diagnóstico precoce e tratamento dos indivíduos doentes, uso de inseticidas para controle do vetor, eutanásia de todos os cães que são sororeativos para *Leishmania* e educação em saúde (DIETZE et al., 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A eutanásia dos cães não é uma medida de controle eficaz, pois muitos cães são assintomáticos para a doença dificultando o diagnóstico. Há, ainda, demora entre o diagnóstico e eutanásia, substituição rápida do animal sacrificado por cães susceptíveis e resistência natural do proprietário em aceitar este tipo de medida, especialmente em cães assintomáticos (FALQUETO et al., 2009; ROMERO; BOEALERT, 2010).

O controle da LV no Brasil apresenta dificuldades e o governo brasileiro tem buscado novas medidas para reduzir a incidência e a morbimortalidade da doença no país. A nova abordagem adotada é a inclusão de áreas não endêmicas para LV e LVC em suas ações de vigilância com o intuito de monitorar a disseminação da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Vários fatores podem estar relacionados com a falta de sucesso nas medidas de controle da LV adotadas pelas ações de saúde pública. Entre eles, podemos citar

a falta de concordância entre os estudos que analisam o impacto da eliminação dos animais sororreagentes na prevalência da infecção humana; falta de padronização nos testes de diagnóstico da LV e LVC; poucos estudos realizados sobre o controle do vetor; e confirmação de que outros animais podem ser fontes de infecção do parasito, como marsupiais e canídeos silvestres (COSTA, 2011; COSTA; VIEIRA, 2001; GONTIJO; MELO, 2004).

Vacinas profiláticas, para cães e humanos, têm sido sugeridas por vários autores e recomendadas pela OMS, como alternativa a eliminação dos animais infectados por *Leishmania* e com isso diminuir a incidência da doença humana (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; DYE, 1996; GONTIJO; MELO, 2004; WHO, 2010).

Outras formas de controle para LVC têm sido sugeridas, como o uso de soluções tópicas com permetrina e coleiras com deltrametrina (NOLI; AUXILIA, 2005). Alguns estudos conduzidos no Irã, Europa e Brasil demonstram que o uso dessas formulações repelentes, sejam de uso tópico ou impregnados em coleiras, diminuem a prevalência da doença nos cães, e consequentemente diminuição da LV (DAVID et al., 2001; FOGLIA MANZILLO et al., 2006; GAVGANI et al., 2002; MAROLI et al., 2001; MIRÓ et al., 2007; REITHINGER et al., 2004).

#### **1.4 Leishmaniose visceral canina (LVC)**

O cão doméstico é considerado o principal reservatório da LV zoonótica na área urbana, devido à alta prevalência da doença nesses animais, presença de grande quantidade de parasitos na sua pele, proximidade com o homem, e as manifestações clínicas da doença poderem demorar meses ou até anos para aparecer nesses animais (ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008; DANTAS-TORRES, 2008; LAINSON; SHAW, 2005; WHO, 2010). Na área rural e silvestre, raposas e cachorros-do-mato (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*, respectivamente) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) são considerados como os principais reservatórios do parasito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

No Brasil, *L. infantum* foi identificada em outros animais, entre eles roedores dos gêneros *Akodon*, *Oryzomys*, *Proechimys*, *Bolomys* e *Rattus* e gato doméstico (*Felis catus*), porém esses animais não são considerados reservatórios do parasito

(DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; OLIVEIRA et al., 2005). Em cães, a LV foi primeiramente descrita em 1908 por Nicolle e Comte na Tunísia, com observação do parasito na pele desses animais (SOLANO-GALLEGOS et al., 2009). Desde então, o cão é considerado como reservatório do parasito, participando diretamente do seu ciclo de transmissão (ALVES, 2006).

No final dos anos 1930, foram observados os primeiros casos isolados de cães naturalmente infectados por *Leishmania* no Brasil. Esses cães eram da mesma área onde havia casos de LV em humanos (DEANE, 1956). Em 1955, no Estado do Ceará, houve um estudo em uma área com grande prevalência de LV, e observou-se a presença de *L. infantum* na pele de homens (16%) e em cães (78%). Esses dados reforçaram a idéia de que o cão faz parte da cadeia de transmissão da LV (DEANE, 1956).

O papel do cão doméstico no ciclo de transmissão da LV não pode ser subestimado, pois cerca de 50% dos cães infectados apresentam a forma assintomática da doença (WHO, 2010). A prevalência de cães infectados com LV é maior e geralmente precede a doença em humanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; WHO, 2010).

A LVC é endêmica em mais de 70 países como Europa, Ásia, África, América Central e América do Sul (SOLANO-GALLEGOS et al., 2011). Há uma estimativa que milhões de cães estão infectados por *Leishmania infantum* nas Américas, e os países com maior número de animais acometidos pela LVC são o Brasil e a Venezuela (BANETH et al., 2008). A prevalência da LVC no Brasil pode variar entre 4% a 75% de acordo com o diagnóstico utilizado e com a região estudada (BARBOSA et al., 2010; SILVEIRA et al., 2012).

No Brasil, entre os anos de 1990 e 1994, foram realizados testes sorológicos para LVC em milhares de cães e destes mais de 80.000 foram eutanasiados, com o intuito de controlar a doença, mas dados indicam que houve um aumento em quase 100% de casos de LV em humanos neste mesmo período (DIETZE et al., 1997).

A doença no cão apresenta altas taxas de prevalência, em locais endêmicos para LVC, cerca de 80% dos animais estão infectados e poucos apresentam manifestações clínicas. A doença não possui um padrão, podendo apresentar diferentes sinais clínicos (BANETH et al., 2008; MORENO; ALVAR, 2002).

No Brasil, desde o ano de 1953, o governo brasileiro adota como medida de controle da LV, a eutanásia de todos os cães que são sororeagentes para *Leishmania*, bem como o controle do vetor com uso de inseticidas e diagnóstico e tratamento dos indivíduos doentes (COSTA, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Essas medidas adotadas pelo governo, não são suficientes para controle da doença, uma vez que as características epidemiológicas e conhecimento insuficiente de todas as informações que compõem a cadeia de transmissão da LV, não têm demonstrado efetividade para a redução dos casos de LV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A eutanásia em massa, de cães com LVC é realizada somente no Brasil como medida de controle da doença (COSTA, 2011). Em vários países, essa medida não ocorre, devido ao fato das pessoas terem um vínculo afetivo com os cães e terem esses animais como integrantes da família e também pelo fato de não haver evidências concretas que justifique essa medida (MIRÓ et al., 2008).

Após a infecção, ocorre a disseminação do parasito pelo corpo do cão em células do SMF e aparecimento dos sinais clínicos, bem como o desenvolvimento da doença vai depender principalmente da resposta do sistema imune do animal. Nos cães, a LVC pode ser de curso agudo ou crônico, e no Brasil cerca de 40% a 60% dos animais são assintomáticos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Apesar dos cães assintomáticos não apresentarem sinais clínicos da doença, uma parcela desses animais é capaz de infectar o vetor (MORENO; ALVAR, 2002; SILVA et al., 2005).

Alguns fatores têm sido relatados como predisponentes para o desenvolvimento da LVC, incluindo idade, sexo e genética. Raças como Pastor Alemão, Cocker Spaniel, Boxer e Rottweiler são consideradas como as mais suscetíveis (Miró et al., 2008). Cães mais (menos de três anos) e mais velhos (mais de oito anos) parecem ser os mais acometidos pela LVC (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

A LVC é considerada uma das principais doenças potencialmente fatais encontrada em cães (MARTIN-SANCHEZ et al., 2007). É caracterizada por pleomorfismo acentuado e os sinais clínicos podem variar de acordo com o estado nutricional e resposta imune dos animais em relação à infecção e virulência do parasito (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

A manifestação clínica mais comum da LVC ocorre no tecido cutâneo, principalmente alterações dermatológicas como: dermatite esfoliativa no rosto, orelha e membros; dermatite ulcerativa; dermatite nodular; dermatite mucocutânea e dermatite papular. Essas manifestações podem ser observadas concomitantemente com outros sinais clínicos (SOLANO-GALLEGOS et al., 2011). Aproximadamente, 60% a 90% dos animais infectados possuem alguma alteração dermatológica (ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008).

Após as dermatopatias, a linfoadenomegalia localizada ou generalizada, é a alteração mais comum, ocorrendo em cerca de 60-90% dos pacientes (ALVAR et al. 2004; AMUSATEGUI et al. 2003; BANETH et al. 2008). Os linfonodos mais afetados são os poplíteos, os pré-escapulares e os submaxilares (ALVAR et al., 2004; LIMA et al., 2004; BANETH et al., 2008)

Outra manifestação clínica comum nos cães é a onicogrifose, presente em cães sintomáticos para LVC e ocorre em 21% a 30% dos animais (BANETH et al., 2008; KOUTINAS et al., 2010).

As alterações oculares podem ser a primeira ou única alteração aparente da LVC, e ocorrem em 16% a 81% dos animais infectados (PEÑA et al., 2000; SAUQUILLO, 2005). As mais comuns são: conjuntivite, uveíte, alopecia periocular e ceratite (BANETH et al., 2008; PEÑA et al., 2000; SAUQUILLO, 2005).

As manifestações renais mais evidentes são as glomerulonefrites, devido a deposição de imunocomplexos (ALVAR et al., 2004; BONFANTI et al., 2004). Essa manifestação interfere na funcionalidade do rim podendo causar insuficiência renal aguda e/ou crônica (BONFANTI et al., 2004; FERRER, 1999).

Outras manifestações importantes da LVC são as alterações hepáticas, que podem comprometer o metabolismo do fígado, entretanto essas alterações não são muito freqüentes (ALVAR et al., 2004; SOLANO-GALLEGOS et al., 2009). As manifestações esplênicas são variáveis, podendo ocorrer espelonomegalia, que pode estar associada com o aumento de monócitos e macrófagos no órgão. Esse tipo de alteração ocorre em 10% a 53% dos cães (BANETH et al., 2008; SANTANA et al., 2008). Pode ocorrer também perda de peso, atrofia muscular, epistaxe, comprometimento dos ossos e das articulações (KOUTINAS et al., 1999; BANETH et al., 2008).

Os testes laboratoriais de bioquímica sérica, hematológicos e de urinálise são importantes na avaliação clínica dos cães infectados, e principalmente para determinar o avanço da LVC, bem como seu prognóstico (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Os achados laboratoriais importantes são: anemia que acomete cerca de 50% a 70% dos animais doentes; contagem total de leucócitos podendo apresentar leucopenia ou leucocitose; trombocitopenia presente em 29% a 50% dos cães (Da COSTA-VAL et al., 2007; ALVAR et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). O aumento nos níveis séricos de creatinina e uréia ocorrem com certa freqüência e acomete cerca de 45% dos cães infectados, sugerindo doença renal (AMUSATEGUI et al., 2003).

Devido a complexidade das alterações e a dificuldade em estabelecer um prognóstico acurado da LVC, recentemente foi proposto um novo sistema de estadiamento, onde os cães são classificados em quatro estágios da doença de acordo com os sinais clínicos, níveis de anticorpos e achados laboratoriais (Quadro 1) (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Quadro 1 - Estágios da leishmaniose visceral canina, baseado em testes sorológicos, exame físico, alterações laboratoriais e prognóstico, proposto por Solano-Gallego et al. (2009)

ESTÁGIO	SOROLOGIA <sup>a</sup>	EXAME FÍSICO	ALTERAÇÕES LABORATORIAIS	PROGNÓSTICO
<b>I DOENÇA LEVE</b>	Negativo ou baixo nível de anticorpos	Sinais leves, como linfoadenopatias e dermatites papulares	Sem alterações importantes. Função renal normal: Creatinina < 1,4 mg/dl e ausência de proteinúria (UPC <sup>b</sup> < 0,5)	Bom
<b>II DOENÇA MODERADA</b>	Baixos a altos níveis de anticorpos	Sinais presentes no estágio I, associado a um ou mais dos seguintes sinais: lesões cutâneas localizadas ou difusas como dermatites esfoliativas e/ou onicogripose, ulcerações (plano nasal, coxins, proeminências ósseas, junções mucocutâneas); anorexia; perda de peso; febre	Anormalidades clinicopatológicas leves como anemia arregenerativa, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia. subestágio (IIa) - perfil renal normal: creatinina <1,4 mg / dl; ausência de proteinúria: UPC < 0,5 subestágio (IIb) - disfunção renal leve: creatinina < 1,4 mg / dl; UPC = 0,5-1	Bom a reservado
<b>III DOENÇA GRAVE</b>	Médios a altos níveis de anticorpos	Além dos sinais dos estágios I e II, os animais podem apresentar alterações relacionadas a deposição de imuno-complexos nos tecidos: vasculites, artrites, uveite e glomerulonefrite	Anormalidades clinicopatológicas dos estágios I e II associado a doença renal crônica em estágio 1 (upc > 1) ou estágio 2 (creatínina 1,4-2 mg/dl), de acordo com critérios da IRIS <sup>c</sup>	Reservado a sombrio
<b>IV DOENÇA MUITO GRAVE</b>	Médios a altos níveis de anticorpos	Sinais clínicos do estágio III, associado a tromboembolismo pulmonar e/ou síndrome nefrótica e doença renal crônica em estágio terminal	Anormalidades clinicopatológicas listadas no estágio II, e doença renal crônica em estágio 3 (creatínina 2-5 mg/dl); ou estágio 4 (creatínina > 5 mg/dl) de acordo com critérios da IRIS; ou síndrome nefrótica: proteinúria elevada: UPC> 5	Sombrio

<sup>a</sup>Nível de anticorpos anti- *Leishmania*: Negativo - Diluição reativa final da RIFI ≤ 1:40

Baixo - RIFI: 1:40 até 1:160

Médio - RIFI: 1:160 até 1:640

Alto - RIFI ≥ 640 (4 vezes maior que o *cut-off*)

<sup>b</sup>UPC – Razão proteína/creatínina urinária

<sup>c</sup>IRIS – International Renal Interest Society

## 1.5 Diagnóstico da leishmaniose visceral canina

Os testes de diagnóstico da LVC são realizados em inquéritos de saúde pública, para levantamentos epidemiológicos e na confirmação de suspeita clínica, naqueles cães que apresentam sinais clínicos da doença (MIRÓ et al., 2008).

Os testes de diagnóstico da LVC são baseados no diagnóstico clínico pelo exame físico e laboratorial, que envolve técnicas parasitológicas, moleculares e sorológicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O diagnóstico por exame físico possui várias limitações, devido ao fato de muitos cães serem assintomáticos e os sinais clínicos semelhantes a outras doenças infecciosas comuns de cães, além da ausência de um padrão de alterações patognomônicas características da LVC (GOMES et al., 2008). Cerca de 50% dos animais infectados não apresentam sinais da doença durante longo período de tempo (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado através de teste parasitológico, exames laboratoriais com análises bioquímicas e hematológicas, teste molecular e sorológico. O parasitológico é realizado em material biológico coletado através de punções aspirativas de linfonodos, fígado, medula óssea e do baço, ou por biopsias de pele, a fim de ser encontrar as formas amastigotas de *Leishmania*. Apesar de possuir especificidade de 100%, não é um método muito utilizado, pois além de ser invasivo é de difícil realização nos programas de saúde pública, além de apresentar baixa sensibilidade quando comparado as técnicas sorológicas e moleculares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; BANETH et al.; 2008; ALVAR et al., 2004).

As técnicas moleculares utilizadas no diagnóstico da LVC como a reação em cadeia da polimerase (PCR) têm apresentado bons resultados de sensibilidade e especificidade. Podem ser utilizados vários tipos de amostra como biopsias de pele, sangue e aspirados de linfonodos e medula óssea. A técnica é realizada com a amplificação de seqüências conhecidas de oligonucleotídeos de *Leishmania* (GOMES et al., 2008). Autores têm sugerido que a técnica de PCR é mais sensível quando empregada em amostras de punção de medula óssea e linfonodo, ou com a pele (FARIA; ANDRADE, 2012).

Os testes sorológicos mais utilizados para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio

imunoenzimático (ELISA), western blotting e aglutinação direta (GRIMAILDI Jr. et al., 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Nos cães infectados há uma ativação da resposta imune humoral com produção de anticorpos IgG anti-*Leishmania*. Os animais podem apresentar níveis elevados desses anticorpos três meses após a infecção e esses níveis podem permanecer por até dois anos (MARCONDES et al., 2011).

No Brasil, os métodos sorológicos mais utilizados para LVC são a RIFI e o ELISA, pois apresentam boa sensibilidade e especificidade, que podem variar de acordo com o antígeno utilizado e a área estuda (ALVAR et al., 2006; MARCONDES et al., 2011).

No ensaio da RIFI são utilizadas formas promastigotas íntegras de *Leishmania* como antígeno. Esse tipo de antígeno pode apresentar reação cruzada com outros parasitos comuns de cães, além de necessitar de equipamentos especializados e profissional habilitado para sua realização, sendo muitas vezes inviável na rotina de inquéritos de saúde pública nos programas controle da LV (ALMEIDA et al., 2005).

A RIFI apresenta melhor sensibilidade quando aplicada em uma população geral de animais de área endêmica e melhor especificidade quando utilizada em cães de área não-endêmica (PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMERO, 2015).

O ELISA é muito utilizado como teste de diagnóstico sorológico para LVC. As principais vantagens do teste são a possibilidade de ser realizado com uma grande numero de amostras de soros de uma única vez e o emprego de antígenos recombinantes ou brutos (MAIA; CAMPINO, 2008). Os valores de especificidade e sensibilidade do ELISA são dependentes de alguns fatores como: espécie do parasito, antígeno utilizado (bruto ou recombinante) e períodos de incubação do parasito (MARCONDES et al., 2011).

Vários tipos de antígenos têm sido utilizados no ELISA para o diagnóstico da LVC. Os mais empregados são o antígeno bruto e as proteínas recombinantes, principalmente a rK39, que apresenta maior sensibilidade e especificidade em relação aos antígenos brutos, e também apresenta como vantagem menor reatividade cruzada com outros parasitos (LIMA et al., 2010).

Apesar do bom desempenho do teste de ELISA, ele pode apresentar reação cruzada com outras doenças como erliquiose, babesiose, neosporose, doença de Chagas e leishmaniose tegumentar americana (ZANETTE et al., 2014).

Para aperfeiçoamento do diagnóstico sorológico da LVC, têm sido desenvolvidos testes imunocromatográficos rápidos (MAIA; CAMPINO, 2008). Estes testes possuem como principais vantagens a verificação dos resultados de forma mais rápida, facilidade de execução, não necessitar de pessoal especializado e nem de laboratório, utilizar pouca quantidade de amostra, a possibilidade de serem utilizados como testes de triagem em clínicas veterinárias particulares e em estudos epidemiológicos (MARCONDES et al., 2011). Apesar dessas vantagens, autores têm relatado que estes testes apresentam sensibilidade e especificidade menores em relação aos testes sorológicos convencionais, fazendo com que não sejam ideais para serem utilizados como teste confirmatório da LVC (LIMA et al., 2010; MAIA; CAMPINO, 2008).

Recentemente um novo teste de diagnóstico foi desenvolvido para aprimorar o sorodiagnóstico da LVC no Brasil (GRIMALDI Jr. et al., 2012). O DPP® *Dual Path Platform* é um imunoensaio de dupla plataforma com partículas de ouro coloidal e proteína recombinante rK28 (fragmentos K26, K39 e K9) como antígeno, capaz de reconhecer anticorpos específicos anti-*Leishmania*. É um teste rápido onde o resultado é observado em 15 minutos, utiliza pouca quantidade de amostra (5µL), pode ser realizado em soro, plasma ou sangue total, não necessita de pessoal especializado e de laboratório, e pode ser realizado em campo (GRIMALDI Jr. et al., 2012; LAURENTI et al., 2014; SANTIS et al., 2013).

O governo brasileiro até o ano de 2012 utilizava o teste de ELISA como triagem e a RIFI como confirmatório para LVC, como parte do “Programa de Controle da Leishmaniose Visceral”. Desde então, o protocolo de diagnóstico oficial para LVC passou a ser o DPP® como teste de triagem e o ELISA como confirmatório (COURA-VITAL et al., 2014).

Autores têm relatado que o DPP® apresenta baixa sensibilidade e especificidade quando empregado em amostras de soros de cães assintomáticos e alta sensibilidade e especificidade quando utilizado em soros de animais sintomáticos (GRIMALDI Jr. et al., 2012).

Em revisão sistemática realizada por Peixoto; Oliveira; Romero (2015) sobre o desempenho dos testes de diagnóstico sorológicos para LVC no Brasil, a RIFI apresentou sensibilidade de 88% e especificidade de 63%; o ELISA sensibilidade de 89% e especificidade de 87% e o DPP® 83% de sensibilidade e 73% de especificidade. Neste trabalho, dentre 284 estudos publicados entre novembro de 2012 e fevereiro de 2013, 25 preencheram os critérios necessários para os cálculos de sensibilidade e especificidade, e, em apenas três foi avaliado o desempenho do DPP®.

Os testes sorológicos para LVC apresentam desvantagens, principalmente quando empregados em área endêmica para outros parasitos, pois podem apresentar reação cruzada com outras espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*, uma vez que ambos possuem epítopos comuns, além de hemoparasitos, em menor proporção (ZANETTE et al., 2014).

O diagnóstico preciso da LVC é difícil de ser realizado uma vez que não existe nenhum teste 100% eficaz e o ideal seria a combinação dos achados no exame clínico e hematobioquímico com várias técnicas disponíveis comercialmente, como testes sorológicos, parasitológicos e moleculares, para melhor acurácia do diagnóstico e para evitar que cães com resultados falso-negativos permaneçam no ambiente e cães falso-positivos sejam eutanasiados (ALVAR et al., 2004; LAURENTI et al., 2014).

## **1.6 Hemoparasitos mais freqüentes em cães no Brasil**

No Brasil os principais hemoparasitos encontrado em cães são *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Mycoplasma haemocanis*, *Hepatozoon canis* e *Anaplasma platys* (RAMOS et al., 2010; TRAPP et al., 2006). Autores sugerem que cães infectados com esses hemoparasitos podem apresentar reação cruzada com *Leishmania* spp. nos testes sorológicos (FERREIRA et al., 2007; LAURENTI, et al., 2014). Por isso é importante avaliar o desempenho dos métodos de diagnóstico sorológico utilizados na saúde pública e em laboratórios privados em animais com outras infecções para prevenir a eutanásia dos cães falso-positivos (FERREIRA et al., 2007).

*Ehrlichia* é uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória da família Anaplamataceae que infecta uma grande variedade de mamíferos e possui tropismo para leucócitos (RAMOS et al., 2010; VIEIRA et al., 2011). A erliquiose canina é causada principalmente pelas espécies *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* e *Ehrlichia ewingii* (LITTLE, 2010). A principal espécie encontrada no Brasil é *E. canis* que causa a doença denominada erliquiose monocítica canina (EMC) (VIEIRA et al., 2011). Os principais sinais clínicos são: linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, anorexia, apatia, vômitos, anemia, leucopenia, trombocitopenia, epistaxe, febre e palidez nas mucosas (CASTRO et al., 2004; DANTAS-TORRES et al., 2008; MOREIRA et al., 2005).

Para diagnóstico de *E. canis* são utilizados métodos sorológicos (RIFI e ELISA), PCR, cultura de células e visualização do parasito em esfregaço sanguíneo (SILVA et al., 2010; VIEIRA et al., 2011).

A babesiose canina é uma doença causada pelo protozoário intracelular do gênero *Babesia*. As espécies envolvidas na infecção são *B. gibsoni* e *B. canis* que é a espécie mais importante no Brasil. *B. canis* possui três subespécies: *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi*. A espécie *B. canis vogeli* é encontrada em regiões subtropicais e tropicais e causa infecção moderada (COSTA-JÚNIOR et al., 2012; RAMOS et al., 2010).

Os sinais clínicos mais importantes são: anorexia, febre, hepatomegalia, esplenomegalia, mucosas pálidas e icterícia. A doença pode ser de curso agudo ou ser transitória, e vai depender da resposta imune do hospedeiro, idade do animal e/ou presença de outras infecções (TAENZLER et al., 2015).

O principal método de diagnóstico utilizado para babesiose canina é o esfregaço sanguíneo corado por Giemsa. (BOOZER; MACINTIRE, 2003; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006). Também são utilizados testes sorológicos como RIFI e ELISA e métodos moleculares como a PCR (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO et al., 2006; VERCAMMEN et al., 1995).

*Hepatozoon* é um protozoário que infecta uma grande variedade de animais entre mamíferos, répteis, anfíbios e pássaros (SMITH, 1996; O'DWYER, 2011). As espécies envolvidas na doença canina são e *Hepatozoon americanum* e *Hepatozoon canis*. *H. canis* é encontrado na África, Europa, Ásia, América do Sul e

América do Norte (apenas Estados Unidos) enquanto que *H. americanum* é encontrado apenas nos Estados Unidos (O'DWYER, 2011).

Os sinais clínicos podem variar de acordo com níveis de parasitemia e resposta do sistema imune dos animais. Os mais encontrados são: diarréia, perda de peso, mucosas pálidas, anorexia, vômito e apatia (PALUDO et al., 2005; O'DWYER, 2011). O diagnóstico da hepatozoonose é realizado por método parasitológico através de observação do parasito em esfregaço sanguíneo, corado com Giemsa, por diagnóstico sorológico realizados pelos ensaios de RIFI e ELISA e por métodos moleculares, realizado por PCR (O'DWYER, 2011; KARAGENC et al., 2006; LI et al., 2008).

*Mycoplasma haemocanis* é uma bactéria gram-negativa do gênero *Mycoplasma* (KEMMING et al., 2004). Essas bactérias se fixam à superfície das células vermelhas do sangue (KEMMING et al., 2004; RAMOS et al., 2010).

As manifestações clínicas incluem anemia grave, que acomete o cão no início da infecção. Na doença crônica, os cães imunocompetentes geralmente não apresentam manifestações clínicas. Os animais que apresentam algum tipo de imunossupressão apresentam sinais clínicos, e os mais comuns são perda de peso, anorexia, febre e letargia (KEMMING et al., 2004; MESSICK, 2004; VALE et al., 2014).

O diagnóstico mais realizado é o esfregaço sanguíneo. Essa técnica apresenta melhores resultados quando realizado em animais com alta parasitemia (início da infecção) (MESSICK et al., 2004). A PCR convencional e PCR em tempo real são testes muito utilizados para o diagnóstico de *M. haemocanis*, por apresentarem alta sensibilidade e especificidade (MESSICK, 2003; VALE et al., 2014).

*Anaplasma platys* é uma bactéria intracelular obrigatória com tropismo para plaquetas, encontrada em vários países (AGUIRRE et al., 2006; RAMOS et al., 2014). No Brasil, *A. platys* é considerado como uma das principais bactérias que infectam cães na área urbana (SANTOS et al., 2007).

Possui como principais sinais clínicos: trombocitopenia cíclica, anorexia, hemorragia petequial, febre e uveíte (KAMANI et al., 2013; WITTER et al., 2013).

O diagnóstico é realizado pela observação do parasito em esfregaço sanguíneo, por método sorológico (RIFI) e por PCR (BREITSCHWERDT, 2004; WITTER et al., 2013).

Estes hemoparasitos são transmitidos por vetores, em geral artrópodes (principalmente carrapatos), e o controle é realizado com o uso de medicamentos ectoparasiticidas e repelentes nos animais e ambiente, além de tratamento dos cães infectados (SHERDING, 2008).

## 2 Justificativa

A leishmaniose visceral é uma doença grave e endêmica em vários países. No Brasil é uma zoonose e o cão doméstico é considerado o principal reservatório do parasito na área urbana.

Uma das principais medidas de controle da doença, adotada pelo governo brasileiro como parte do “Programa de controle da leishmaniose visceral”, é a eliminação dos cães soropositivos para *Leishmania*. Atualmente os testes empregados para o diagnóstico sorológico da LVC são o DPP® como teste de triagem e ELISA como teste confirmatório. Entretanto, estudos demonstram que o DPP® não apresenta boa sensibilidade quando realizado em cães assintomáticos, pois esses animais apresentam baixos níveis de anticorpos. Estudos sugerem ainda que o desempenho do DPP® pode ser influenciado quando o teste é aplicado em amostras de soro de animais infectados com patógenos, dentre eles, os hemoparasitos.

Atualmente, o Brasil é o único país que faz a eliminação em massa dos cães soropositivos para *Leishmania*, como medida de controle da LV. Por isso é importante a avaliação dos testes sorológicos realizados pelo governo brasileiro como parte das ações do programa de controle da LV para evitar que animais com resultados falso-negativos permaneçam no ambiente e que os falso-positivos sejam eliminados.

Em razão disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho do teste rápido DPP®, RIFI e ELISA em amostras de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* de área endêmica, classificados de acordo com estágio clínico da LVC, e em amostras de soro de cães não infectados de área não-endêmica e de animais infectados por hemoparasitos.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o desempenho do teste imunocromatográfico rápido de dupla plataforma DPP® *Dual Path Platform* (Bio-Manguinhos/Fiocruz, Brasil) e dos testes sorológicos reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA), que utilizam antígenos brutos de *Leishmania (L.) infantum*, no diagnóstico da leishmaniose visceral canina e reação cruzada com hemoparasitos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o desempenho dos testes DPP®, RIFI e ELISA, que utilizam antígenos brutos de *Leishmania (L.) infantum* (RIFI *in-house* e ELISA *in-house*) em amostras de soros de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum*;
- Avaliar o desempenho dos testes DPP®, RIFI *in-house* e ELISA *in-house* em amostras de soros de cães provenientes de área livre de leishmaniose visceral;
- Avaliar do desempenho do teste DPP®, RIFI *in-house* e ELISA *in-house* em amostras de soros de cães soronegativos para leishmaniose visceral canina e infectados por hemoparasitos;
- Comparar os parâmetros sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia obtidos para o teste DPP® com aqueles obtidos pelos testes sorológicos convencionais RIFI *in-house* e ELISA *in-house*.

## 4 Material e Métodos

### 4.1 Animais

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU), protocolo nº 039/2013 (ANEXO 1) e Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA-UFMG), protocolo nº 211/2007) (ANEXO 2). Todos os procedimentos de manipulação dos animais foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Medicina Veterinária, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA, e *Principles of Laboratory Animal Care – NIH/EUA*.

### 4.2 Amostras de Soro

Para a realização deste estudo foi utilizado um painel de 180 amostras de soros de cães. As amostras fazem parte da soroteca do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os soros são mantidos sob refrigeração a -20°C.

#### 4.2.1 Soros de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*

As amostras de soros de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum*, foram obtidas de animais que fizeram parte do projeto “Avaliação de um protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, associado ao alopurinol, no tratamento da leishmaniose visceral canina” (CETEA-UFMG, protocolo nº 211/2007), conduzido pelo nosso grupo de pesquisa, conforme descrito brevemente a seguir.

Foram utilizadas 60 amostras de soro de cães sem raça definida, de ambos os sexos e diversas idades, naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum*, provenientes da cidade de Ribeirão das Neves (Minas Gerais, Brasil), área considerada endêmica para LV e LVC. Esses cães foram previamente identificados por testes sorológicos RIFI e ELISA (Biomanguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil)

e capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses como parte das atividades do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral do Município. Posteriormente, a infecção foi confirmada pela visualização do parasita em esfregaço de medula óssea (corado com Giemsa) e com resultado positivo na Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em aspirado de medula óssea, utilizando iniciadores específicos para *L. infantum* (SILVA et al., 2009). Após a confirmação da infecção, os animais foram examinados a fim de verificar a presença de sinais clínicos da LVC e foi coletada amostra de 10,0mL de sangue, por venopunção da veia jugular. Este volume foi imediatamente fracionado da seguinte forma (a) alíquota de 3,0mL em tubo sem anticoagulante, para a realização dos testes sorológicos; (b) alíquota de 3,0mL em tubo contendo anticoagulante EDTA, para a realização de hemograma completo; e (c) alíquota de 4,0mL em tubo sem anticoagulante, para a realização das provas bioquímicas: determinação dos níveis séricos de uréia, creatinina, fosfatase alcalina, proteínas totais, globulinas, albuminas, relação albumina/globulina (A/G). Baseado nas alterações encontradas no exame físico e nos exames hematobioquímicos, associados ao título de anticorpos anti-*Leishmania*, os animais foram classificados em estágios clínicos da LVC de acordo com Solano-Gallego et al. (2009) (Quadro 1), adaptado por SILVA et al., 2012 (Tabela 1). Dos 60 cães, seis foram classificados no estágio I, 25 no estágio II e 29 no estágio III da LVC. Nenhum cão foi classificado no estágio IV.

Tabela 1 – Classificação da leishmaniose visceral canina em estágios clínicos proposta por Solano-Gallego et al. (2009), adaptada por Silva et al., (2012)

Estágio Clínico	Título da RIFI	Sinais Clínicos	Alterações hematobioquímicas
Estágio I Doença Leve	Negativo ou $\leq 1:320$	Linfodenopatia e/ou uma alteração dermatológica leve (p. ex. dermatite popular, dermatite esfoliativa, dermatite seborréica, onicogripose)	Sem alterações; creatinina $< 1,4 \text{ mg/dL}$ ; uréia $< 25 \text{ mg/dL}$ ; razão A/G $\geq 0,6$
Estágio II Doença moderada	$\geq 1:80$	Linfodenopatia associada a dois ou mais sinais clínicos: alterações dermatológicas (p. ex. dermatite popular, dermatite esfoliativa, dermatite seborréica, onicogripose); anorexia, conjuntivite mucopurulenta; febre, epistaxe	Anemia moderada a regenerativa e/ou hipergamaglobulemia, hipoalbuminemia; creatinina $< 1,4 \text{ mg/dL}$ e uréia $> 25 \text{ mg/dL}$ ; razão AG $\leq 0,6$
Estágio III Doença Grave	$\geq 1:160$	Sinais clínicos do estágio II e alterações relacionadas a deposição de imunocomplexos como uveite, vasculite	Anemia moderada a regenerativa e/ou hipergamaglobulemia, hipoalbuminemia; creatinina 1,4-2 mg/dL e uréia $> 25 \text{ mg/dL}$ ; razão A/G $\leq 0,6$
Estágio IV Doença muito grave	$\geq 1:640$	Sinais clínicos do estágio III e sinais de doença renal crônica como síndrome nefrótica ou crises uremicas	Anemia regenerativa e hipergamaglobulemia, hipoalbuminemia; creatinina $> 2 \text{ mg/dL}$ e uréia $> 25 \text{ mg/dL}$ ; razão A/G $\leq 0,6$

#### **4.2.2 Soros de cães não infectados**

O grupo de animais não infectados foi constituído por amostras de soro de 74 cães de diversas raças, ambos os sexos e várias idades, hígidos ao exame físico, provenientes da cidade de Cruz das Almas (Bahia, Brasil), região sem notificação de casos de LVC e LV. Após exame físico, uma alíquota de 3,0mL de sangue foi coletada, por venopunção da veia jugular ou cefálica, e transferida para um tubo sem anticoagulante, para a realização dos testes sorológicos. Só foram incluídas no estudo amostras de cães que nasceram em Cruz das Almas e que sempre viveram na área considerada urbana da cidade.

#### **4.2.3 Soros de cães infectados com hemoparasitos**

Com o objetivo de avaliar o desempenho dos testes DPP®, RIFI *in-house* e ELISA *in-house* em soros de animais infectados com hemoparasitos, foram utilizadas amostras coletadas de 46 cães de diversas raças, ambos os sexos e várias idades, provenientes da cidade de Uberlândia (Minas Gerais, Brasil). As amostras de sangue desses animais, foram coletadas durante a rotina de atendimento no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia e como parte dos projetos “Inquérito molecular e parasitológico do *Hepatozoon* sp., em cães naturalmente infectados, procedentes de área urbana e rural, da microrregião de Uberlândia – MG” e “Prevalência e *Babesiose* em cães da microrregião de Uberlândia – MG”, coordenados pela profa Drª Márcia Cristina Cury, do Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular do ICBIM/UFU.

Após o exame físico, foi realizada extensão em lâmina de vidro com uma gota de sangue coletada da ponta da orelha do cão, que foi corada pelo Giemsa e analisada em microscópio de luz com aumento de 400X. Confirmada a infecção por hemoparasitos, uma alíquota de sangue (3,0mL) foi coletada por venopunção da veia cefálica, e transferida para tubo sem anticoagulante, para a realização dos testes sorológicos. Das 46 amostras utilizadas nesse trabalho, 15 eram provenientes de cães infectados por *Ehrlichia canis*, 06 por *Hepatozoon canis*, 23 soros de animais co-infectados por *E. canis* e *Babesia canis* e 02 amostras de cães co-infectados por *E. canis*, *B. canis* e *Mycoplasma haemocanis*.

## 4.3 Testes Sorológicos

### 4.3.1 DPP® Dual Path Platform (Bio-Manguinhos / Fiocruz, Brasil)

O teste imunocromatográfico rápido DPP® Dual Path Platform (Bio-Manguinhos/Fiocruz, Brasil) foi gentilmente cedido pelo prof. Dr. Raul Rio Ribeiro (Universidade Federal de Juiz de Fora) e realizado segundo instruções do fabricante. Inicialmente as 180 amostras foram codificadas por números. Após a codificação, cinco microlitros foram adicionados no poço 01 (“Amostra + Tampão”) do teste juntamente com duas gotas de tampão (incluído no kit). Após cinco minutos, quatro gotas do mesmo tampão foram adicionadas no poço 02 (“Tampão”), e após dez minutos foi realizada a leitura. O teste foi considerado positivo quando houve o aparecimento de duas linhas, uma de controle (C) e outra de teste (T); e negativo quando houve apenas a linha do controle (C) (Figura 1).

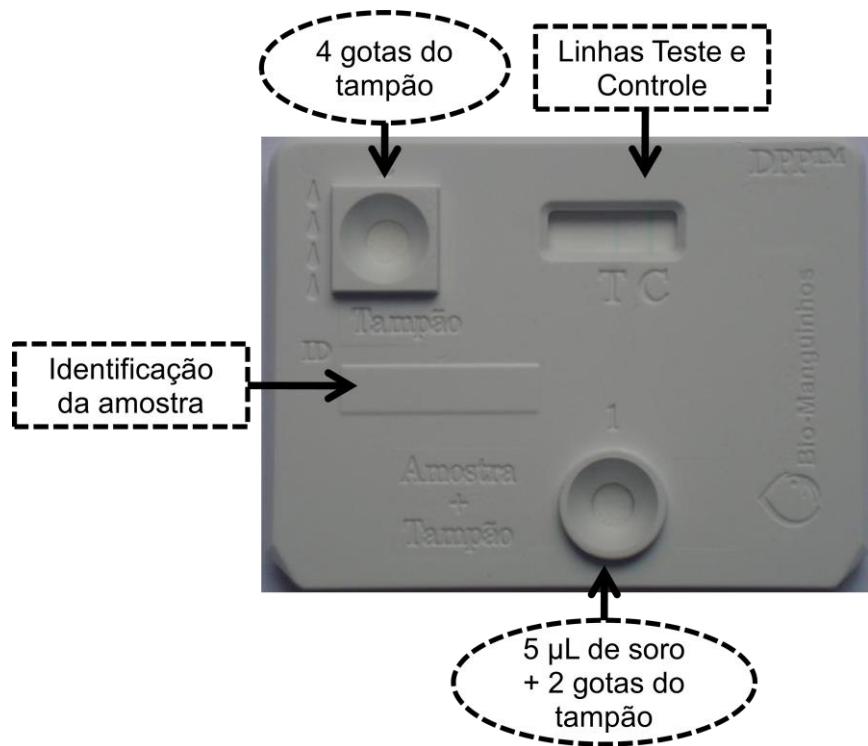


Figura 1: Dispositivo DPP® Dual Path Platform – Bio-Manguinhos

As leituras dos resultados foram realizadas por duas pessoas, de maneira independente e que não sabiam a que grupo pertencia a amostra analisada, com o objetivo de minimizar possíveis vieses de leitura e interpretação de resultados. Resultados inconsistentes foram repetidos com a amostra recebendo nova numeração.

#### 4.3.2 Reação de Imunofluorescência indireta - RIFI

A dosagem de IgG total pela RIFI-*in house* foi realizada segundo metodologia descrita por Camargo (1974), com modificações (SILVA, 2007).

Inicialmente foi preparado o antígeno com culturas de promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1967/BH46) em fase estacionária de crescimento em meio de cultura α-MEM. As culturas foram centrifugadas em solução de formol tamponado 10% (v/v) por 10 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspensionado em solução salina contendo formol 10% tamponado (1:2, v/v). A seguir, as células foram homogeneizadas por 10 minutos. Foi realizada nova centrifugação por 10 minutos a 3.000 rpm. Os parasitos foram lavados três vezes em PBS (pH=7,2). Após as lavagens, o “pellet” foi ressuspensionado em PBS e os parasitos contados, e concentração ajustada para 18 a 20 formas promastigotas por campo. Posteriormente, os parasitos foram distribuídos em áreas demarcadas nas lâminas de vidro que foram deixadas em temperatura ambiente para secagem e após, armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Para a obtenção do título desejado, os soros testados foram diluídos na razão dois, a partir de 1:40, em solução tampão fosfato (PBS – 0,85% p/v NaCl, 0,132% p/v de NaHPO<sub>4</sub>, 0,0156% p/v de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O em água destilada, pH 7,4). 15 µL desta solução foram depositados sobre cada região demarcada da lâmina de vidro, na qual foi previamente fixado o antígeno. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C e, a seguir, foram lavadas e cobertas com PBS por 5 minutos, seguido de lavagem com água destilada e secagem a temperatura ambiente. A seguir, foi acrescentado 15 µL do conjugado, constituído por anti IgG de cão, marcado com Isotiocianato de Fluoresceína (Bethyl Lab. Inc., EUA) diluído a seu título, em PBS, com Tween 2% (v/v) e Azul de Evans 1% (p/v). Após a adição do conjugado, as lâminas foram incubadas, lavadas com PBS, secas, e cobertas com glicerina tamponada (65 mL de glicerina P.A diluída em 35 mL de solução contendo 1,78 % (p/v) de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 1,38% (p/v) de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8), e lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de luz ultravioleta. Para cada soro foi determinada a diluição reativa final, ou seja, a maior diluição em que a leitura mostrava fluorescente. Em todas as lâminas foram utilizados controles positivo, negativo e branco (PBS). Todas as reações foram realizadas em duplicata.

O controle positivo do teste foi “pool” de soros de cães com LVC, provenientes de área endêmica (Belo Horizonte, Minas Gerais), com infecção comprovada pela visualização do parasito em esfregaço de medula óssea (corado com Giemsa) e resultados positivos na PCR específica (SILVA et al., 2009) e na cultura de aspirado de medula óssea. Como controles negativos, foram utilizados soros de cães provenientes de área não endêmica (Minnesota, EUA) para LVC e com resultados negativos na PCR específica de aspirado de medula óssea.

Para a realização da RIFI primeiramente foi realizado a padronização do teste no Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* do ICBIM/UFU, com diluições seriadas do conjugado, testadas em amostras de soros de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* (“pool”) de área endêmica para LVC (Belo Horizonte, Minas Gerais). Os resultados demonstraram que a melhor diluição do conjugado para este trabalho foi de 1:150.

#### **4.3.3 Ensaio imunoenzimático - ELISA**

A técnica de ELISA *in-house* foi realizada de acordo com Voller et al. (1979) com modificações (AMORIM et al., 2011).

O antígeno foi preparado com culturas de promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1967/BH46). As culturas, foram centrifugadas três vezes em 10 mL de PBS, por 15 minutos, 3.500 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspêndido em 2,0 mL de PBS ( $10^8$  parasitos por mL). A seguir, foram realizados cinco ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (37°C) e posterior ruptura das células por ultrasonicação por cinco vezes, em gelo, por 45 segundos a 40 Hz. Para determinação da quantidade de proteína foi utilizado método de Lowry (1951) e concentração foi ajustada para 20 µg/mL em PBS com inibidores de protease. O antígeno foi separado em alíquotas e congelado a -80°C até o momento do uso (SILVA, 2007).

No ensaio de ELISA foi utilizado o conjugado anti-IgG de cão marcado com peroxidase (Bethyl Lab. Inc., EUA), diluído a seu título, de acordo com Silva (2007). Os resultados da padronização dos testes indicaram que a melhor diluição do conjugado foi de 1.10.000, e das amostras de soro de 1:400.

As reações foram realizadas em microplacas de polietileno de 96 orifícios e fundo plano. Cada orifício da placa foi sensibilizado com 2 µg do antígeno diluído em 100 µL de tampão carbonato (0,159% p/v de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 0,293% p/v NaHCO<sub>3</sub> diluídos em água destilada, pH 9,6). As placas foram incubadas a 4°C por 18 horas para sensibilização. A seguir, o excesso de antígeno foi removido com solução de lavagem (0,9% p/v NaCl e 0,05mL v/v Tween® 20 em água destilada). A seguir, as placas foram secadas e adicionados 150 µL da solução de bloqueio de sítios inespecíficos (caseína 2% p/v em PBS, pH 7,6) em cada orifício, seguindo incubação a 37°C por 30 minutos. Após lavagem e secagem das placas, 100 µL dos soros diluídos (1:400) em tampão de incubação (caseína 0,25% p/v e 0,05% Tween® 20 em PBS, pH 7,6) foram adicionados na placa, em triplicata. Seguiu nova incubação a 37°C por 45 minutos, lavagem e secagem das placas, e foi acrescentado 100 µL do conjugado diluído em tampão de incubação por orifício. Após nova incubação a 37°C por 45 minutos, lavagem e secagem das placas foi adicionado 100 µL por orifício de solução do substrato (10mg de cromógeno *orthophenylenediamine* – OPD, 4 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 v em 10 mL de solução tampão do substrato, composta por 0,719 % p/v de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,519% ácido cítrico diluídos em água destilada, pH 5). As placas foram mantidas por 10 minutos em temperatura ambiente e na ausência de luz, e então a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N por orifício. Os resultados foram expressos em valores de absorbância após leitura das placas em leitor de ELISA no comprimento de onda de 495 nm.

Para cada placa, o ponto de corte ou “cut off” foi estabelecido a partir da média das leituras de absorbância de oito soros de cães não infectados procedentes de região não-endêmica para a doença (Minnesota, EUA) mais duas vezes o desvio padrão. Além dos controles negativos, em todas as placas foi utilizado controle positivo e branco (tampão de incubação).

## 5 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, de acordo com a natureza dos dados, pelos testes que mais se aplicaram a cada caso, com o auxílio dos programas de pacotes estatísticos GraphPad® Instat 5 (GraphPad Software Inc, EUA)

Os testes estatísticos utilizados foram baseados no tipo de distribuição amostral das variáveis, verificado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Testes paramétricos foram utilizados naquelas que apresentaram distribuição do tipo normal, e não paramétricos para as variáveis que não apresentaram distribuição gausiana.

Para comparação entre os resultados dos títulos da RIFI e absorbância determinados pelo ELISA com os estágios da LVC foi utilizado o teste de Análise de Variâncias (ANOVA), seguido do teste de Bonferroni.

O teste de Spearman foi a medida de correlação linear simples adotada para verificar a existência de associação entre as variáveis RIFI e ELISA. O coeficiente Kappa foi utilizado para avaliar o nível de associação entre as técnicas sorológicas DPP, ELISA e RIFI. Para ambos, o coeficiente varia entre -1 a 1, e os valores obtidos foram interpretados de acordo com os seguintes critérios: (a) entre 0 e 0,3 ou -0,3 e 0, fraca associação (b) entre 0,31 e 0,7 ou -0,31 e -0,7, moderada associação; e (c) entre 0,71 e 1 ou -0,71 e -1, forte associação. O sinal positivo ou negativo indica o caráter da associação, se é positiva ou negativa, respectivamente, entre as variáveis.

Os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) foram calculados para todos os testes, conforme demonstrado a seguir (SILVA et al., 2013):

Sensibilidade=[número dos verdadeiros positivos/(número dos verdadeiros positivos + número dos falsos negativos)] x 100

Especificidade=[número dos verdadeiros negativos/(número dos verdadeiros negativos + número dos falsos positivos)] x 100

VPP=[número dos verdadeiros positivos/(número dos verdadeiros positivos + número dos falsos positivos)] x 100

VPN=[número dos verdadeiros negativos/(número dos verdadeiros negativos + número dos falsos negativos)] x 100

Acurácia=[número dos verdadeiros positivos + número dos verdadeiros negativos / (número dos verdadeiros positivos + número dos verdadeiros negativos + número dos falsos positivos + número dos falsos negativos)]

Em todos os testes foi observado um nível de significância de 5%.

## 6 Resultados

### 6.1 DPP® Dual Path Platform

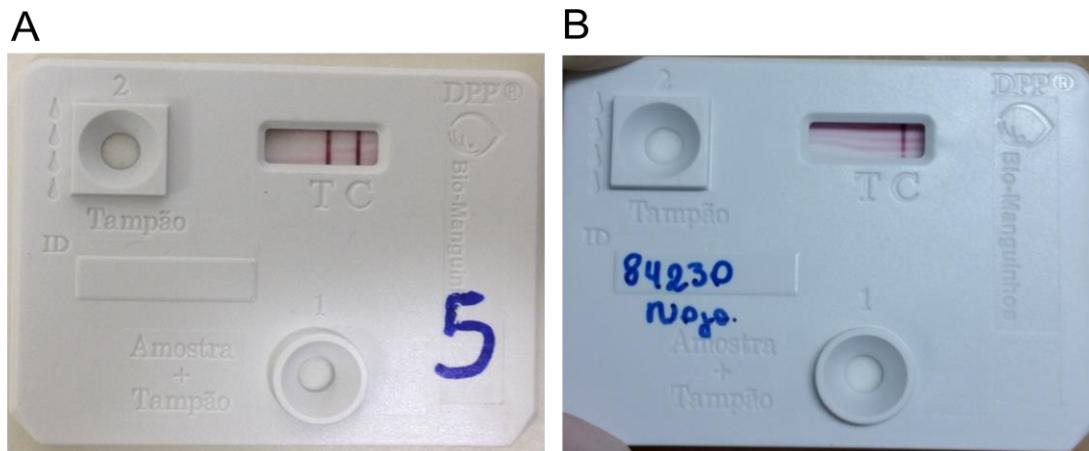


Figura 2 – Imagem ilustrativa do dispositivo DPP® Dual Path. (A) DPP® com resultado positivo; (B) DPP® com resultado negativo

Do total de 180 amostras de soro, 58 (32,22%) foram positivas no teste DPP®.

O teste foi positivo em 56/60 (93,3%) amostras de soros dos cães naturalmente infectados por *L. infantum*, o que representa sensibilidade de 93,33%. Todas as amostras negativas no teste (n=04) foram de animais classificados no estágio I da LVC (Tabela 2). O teste apresentou bons resultados nos animais classificados nos estágios II e III (Tabela 2), com 100% de positividade nos dois grupos.

Apenas 01/74 (1,35%) amostras de soro dos animais não infectados (área não-endêmica) foi positiva no DPP® e o teste apresentou especificidade de 98,33%.

No grupo dos animais infectados com hemoparasitos, 01/46 (2,17%) amostras de soro apresentou-se positiva no DPP®. Essa amostra foi coletada de um cão co-infectado com *Ehrlichia canis* + *Babesia canis* (Tabela 3).

Tabela 2 – Desempenho do DPP® *Dual Path Platform* (Biomanguinhos/Fiocruz, Brasil) em amostras soros de cães naturalmente infectados por *Leishmania* (*L.*) *infantum* classificados de acordo com estágios clínicos da leishmaniose visceral canina\*

	Estágios Clínicos da LVC		
	I	II	III
DPP® (+)	3,3% (02/60)	41,7% (25/60)	48,3% (29/60)
DPP® (-)	6,7% (04/60)	0,0% (0/60)	0,0% (0/60)
Total	10,0% (06/60)	41,7% (25/60)	48,3% (29/60)

\* Solano-Gallego et al. (2009) com modificações (Silva et al., 2012)

## 6.2 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Das 180 amostras de soro, 63 (35,0%) apresentaram-se reativas para *L. infantum* na RIFI. No grupo dos animais naturalmente infectados por *L. infantum*, 59/60 (98,33%) amostras de soro foram reativas para *Leishmania* no teste, apresentando sensibilidade de 98,33%. A diluição reativa final dos soros variaram de 1:80 como diluição mínima e 1:10.240 como diluição máxima. A figura 3 apresenta a freqüência das diluições nas amostras dos soros dos cães nos diferentes estágios da LVC. O título da RIFI nos cães no estágio I variou entre 1:160 a 1:640 (n=5); no estágio II entre 1:80 a 1:5.120 (n=25) e no estágio III entre 1:320 a 1:10.240 (n=29). A única amostra de soro negativa no teste foi de um cão no estágio I da LVC.

A análise estatística demonstrou os valores da mediana da diluição reativa final da RIFI dos animais classificados como estágio III foi significativamente maior que aqueles animais classificados como estágios I e II ( $p<0,0001$  e  $p<0,05$ , respectivamente; ANOVA; pos teste de Bonferroni; IC=95%).

No grupo dos animais não infectados (área não-endêmica), 04/74 (5,4%) amostras de soros foram reativas para *Leishmania* na RIFI, apresentando especificidade de 96,67%. Todas as amostras positivas apresentaram reatividade na diluição de  $\leq 1:40$ .

Não houve resultado positivo na RIFI nas 46 amostras de soro de cães infectados com hemoparasitos.

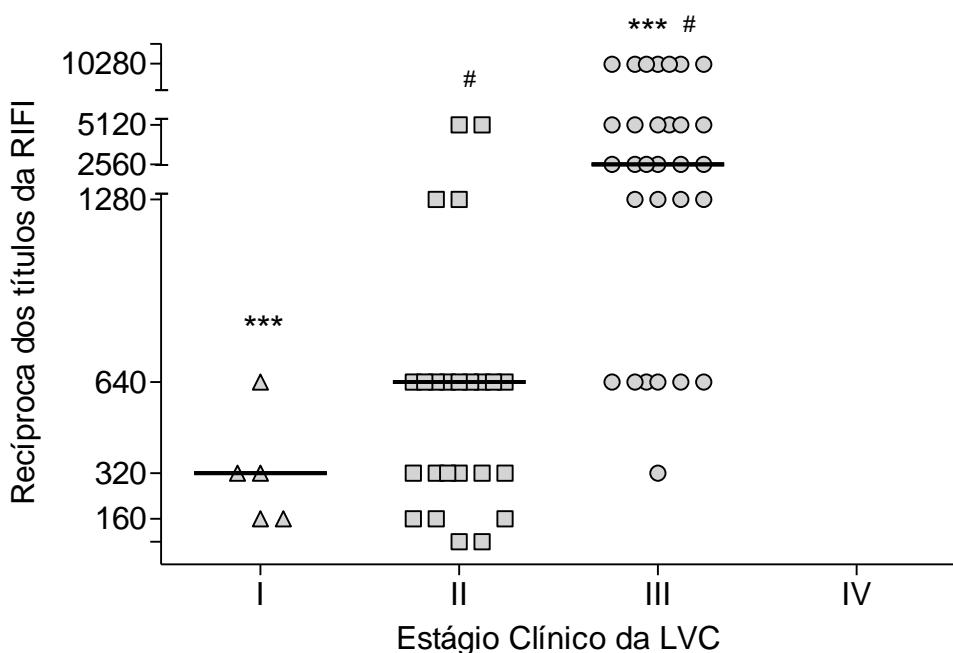


Figura 3 - Recíproca dos títulos da RIFI em soros de 60 cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum* provenientes da cidade de Ribeirão das Neves (MG) em relação aos diferentes estágios clínicos da leishmaniose visceral canina proposto por Solano-Gallego et al. (2009), adaptado por Silva et al. (2012).: (—) Mediana; \*\*\*  $p<0,0001$ ; #  $p<0,05$

### 6.3 ELISA

O teste de ELISA, realizado nas 180 amostras de soros, apresentou 72 (40,0%) resultados positivos. Todas as amostras de soro dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* (60/60) foram positivas no ELISA e o teste apresentou sensibilidade de 100%. A figura 4 apresenta as absorbâncias nos diferentes estágios da LVC.

Assim como observado na RIFI, a análise estatística demonstrou que os valores da mediana das absorbâncias determinadas pelo ELISA, nas amostras dos animais classificados como estagio III, foi significativamente maior que os classificados como estágios I e II ( $p<0,001$ ; ANOVA; pos teste de Bonferroni; IC=95%).

No grupo dos animais não infectados (área não-endêmica), 04/74 (5,4%) amostras de soro foram positivas no ELISA e o teste apresentou especificidade de 90,0%.

Nos animais infectados com hemoparasitos, 08/46 (17,40%) amostras de soro apresentaram-se positivas no ELISA. As amostras positivas eram de seis cães infectados por *Ehrlichia canis* e duas amostras por *Hepatozoon canis* (Tabela 3).

A correlação entre os testes RIFI e ELISA foi realizada no grupo dos cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. A Figura 5 apresenta essa correlação.

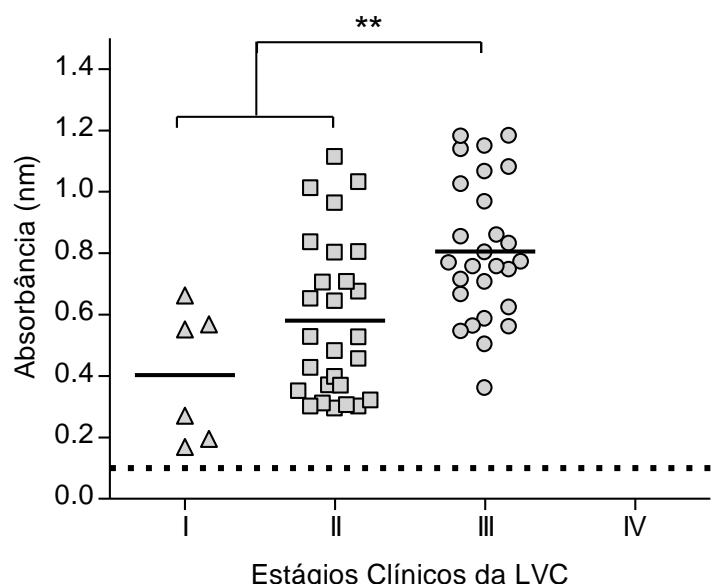


Figura 4 - Absorbância determinada pelo teste de ELISA em soros de 60 cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum* provenientes da cidade de Ribeirão das Neves (MG) em relação aos diferentes estágios clínicos da leishmaniose visceral canina proposto por Solano-Gallego et al. (2009), adaptado por Silva et al. (2012).; (—) Mediana; (....) "cut off"; \*\*p<0,001

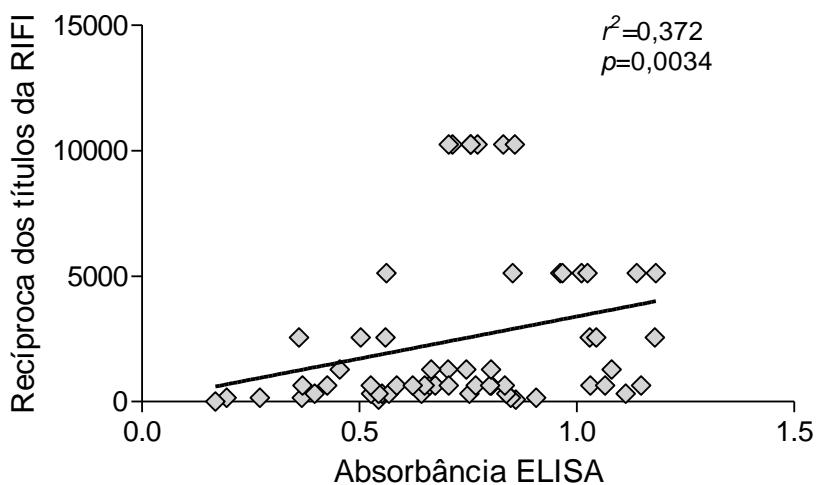


Figura 5 - Correlação entre os resultados dos testes de ELISA e RIFI determinados em soros de 60 cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum* provenientes da cidade de Ribeirão das Neves (MG)

A análise estatística dos dados indicou concordância de 100% nos resultados da RIFI e ELISA e correlação moderada positiva entre os valores de absorbância determinados pelo teste de ELISA e a diluição reativa final da RIFI nas amostras (Correlação de Spearman = 0,372;  $p < 0,0034$ , IC 95%).

Nas 180 amostras de soro, a análise estatística de concordância demonstrou forte associação entre os testes DPP® e ELISA ( $\text{Kappa} = 0,785$ ,  $p < 0,001$ , intervalo de confiança 95%). Da mesma maneira os testes DPP® e RIFI estão fortemente associados ( $\text{Kappa} = 0,888$ ,  $p < 0,001$ , intervalo de confiança 95%). O RIFI e o ELISA também se mostraram fortemente associados ( $\text{Kappa} = 0,799$ ,  $p < 0,001$ , intervalo de confiança 95%).

Tabela 3 – Freqüência da reatividade cruzada do DPP® Dual Path Platform, RIFI e ELISA em soro de cães infectados com hemoparasitos

Hemoparasites	DPP® % (n)	ELISA % (n)	RIFI % (n)
<i>Ehrlichia canis</i> (n=15)	0.0% (0)	13.05% (06)	0.0% (0)
<i>Hepatozoon canis</i> (n=6)	0.0% (0)	4.35% (02)	0.0% (0)
<i>Ehrlichia canis</i> + <i>Babesia canis</i> (n=23)	2.17% (1)	0.0% (0)	0.0% (0)
<i>Ehrlichia canis</i> + <i>Babesia canis</i> + <i>Mycoplasma haemocanis</i> (n=2)	0.0% (0)	0.0% (0)	0.0% (0)
Total (n=46)	2.17% (1/46)	17.40% (8/46)	0.0% (0)

#### **6.4 Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia**

Para todos os testes sorológicos (DPP®, RIFI e ELISA) foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN, e acurácia. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia para DPP® *Dual Path Platform* (Biomanguinhos/Fiocruz, Brasil), ELISA e RIFI

Parâmetros	DPP® % (n)	ELISA % (n)	RIFI % (n)
Sensibilidade	93,33%	100%	98,33%
Especificidade	98,33%	90,0%	96,67%
VPP	98,24%	93,75%	93,65%
VPN	96,72%	100%	99,15%
Acurácia	96,66%	93,33%	97,22%

## 7 Discussão

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença grave que pode levar o indivíduo a morte se não diagnosticada e tratada precocemente (LAINSON; SHAW, 2005; MAURICIO et al., 2001; WHO, 2010). O cão doméstico é considerado o principal reservatório da LV zoonótica, pelo contato próximo com o homem e por apresentar grande quantidade de parasitos na pele (LAINSON; SHAW, 2005; WHO, 2010).

A doença no cão, leishmaniose visceral canina (LVC), possui como principais sinais clínicos as dermatopatias, linfodenopatias, onicogrifose, perda de peso, lesões nos olhos, alterações bioquímicas e hematopoiéticas, doença renal, anemia, hepatomegalia, esplenomegalia, atrofia muscular, epistaxe, comprometimento dos ossos e das articulações (ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008; KOUTINAS et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). As manifestações clínicas vão depender do estado nutricional e resposta imune do cão infectado, e cerca de 50% dos animais são assintomáticos para a doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

No Brasil, o controle da LV é baseado no diagnóstico e tratamento dos doentes, controle do vetor e eliminação dos cães soropositivos (GRIMALDI Jr et al., 2012). Desde o ano de 1953, a eliminação dos cães é uma das principais ações realizadas no controle da LV no país, além de ser uma medida controversa, ela causa pouco ou nenhum impacto na incidência dos casos de LV na saúde pública (COURTENAY et al., 2002). Em muitos países, a eliminação em massa dos cães soropositivos para *Leishmania* não ocorre, pois reconhecem que esses animais possuem um importante vínculo afetivo com seus donos (MIRÓ et al., 2008).

Atualmente, o Brasil é o único país que adota um programa de eliminação de cães soropositivos, em larga escala, como parte das medidas de controle para a LV (Costa, 2011). Costa (2011) comparou os resultados do controle da LV no Brasil nos últimos 30 anos com os da China, que utiliza as mesmas medidas de controle. O autor observou que, atualmente, a China notifica cerca de 10 vezes menos casos que o Brasil, enquanto a notificação no Brasil era 10 vezes menor que a chinesa há 30 anos. O autor sugere que este fato pode ser explicado com o tipo de estratégia de controle da doença adotado em cada país. No Brasil o controle é baseado principalmente na eliminação dos cães soropositivos para *Leishmania*, enquanto que

a China prioriza a eliminação do vetor e, em segundo plano, dos animais sororregantes.

Segundo Moreira et al. (2005), somente o sacrifício de cães soropositivos não é suficiente para o controle da LV e da LVC, mesmo quando são utilizadas técnicas mais sensíveis e redução do intervalo de tempo entre o diagnóstico e a remoção dos cães. Estes autores afirmam, ainda, que é alta a taxa de reposição de animais seguida ao sacrifício dos cães, seja por filhotes susceptíveis ou por outros cães já acometidos pela infecção. Sugerem, também, que estes fatos têm contribuído para a ineficácia das medidas de controle, associados a outros fatores de ordem operacional.

Os métodos de diagnóstico utilizados no Brasil, para LVC são: parasitológico, sorológico e molecular (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Os mais empregados são os testes sorológicos, principalmente a imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA).

No Brasil um novo teste sorológico foi desenvolvido a fim de melhorar o diagnóstico da LVC. O DPP® *Dual Path Platform* (Bio-Manguinhos/Fiocruz, Brasil) é um teste imunocromatográfico rápido que utiliza uma proteína recombinante rK28. A rk28 é uma repetição de 39 aminoácidos conservados (fragmentos das proteínas k26, k39 e k9) entre as espécies de *Leishmania* causadoras de LV (*L. donovani*, *L. infantum*, e *L. chagasi*) que reconhecem anticorpos anti-*Leishmania* específicos. O teste é fácil de ser realizado e não necessita de pessoal treinado ou laboratório especializado (SANTIS et al., 2013; GRIMALDI Jr. et al., 2012; LAURENTI et al., 2014).

Nas condições do estudo, nossos resultados demonstraram que o teste DPP® apresentou bons resultados de sensibilidade (93,33%), entretanto, os melhores resultados foram obtidos pelo ELISA e RIFI que apresentaram sensibilidade de 100% e 98,33%, respectivamente. Por outro lado, a especificidade do DPP® (98,33%) foi melhor do que observado nos testes de ELISA (90,0%) e RIFI (96,67%). Apesar da RIFI apresentar melhor especificidade em relação ao ELISA, o teste não é mais utilizado no “Programa de controle da leishmaniose visceral” desde o ano de 2012, pelo governo brasileiro (COURA-VITAL et al., 2014).

Os testes sorológicos para LVC podem apresentar baixa sensibilidade e especificidade, resultados falso-positivos e falso-negativos, subestimando a real

prevalência dos cães infectados, assim um diagnóstico sorológico preciso é fundamental para o controle da doença (FALQUETO et al., 2009).

A sensibilidade dos testes sorológicos para diagnóstico da LVC pode variar de acordo com o curso clínico da infecção, resposta imune do hospedeiro e tipo de antígeno utilizado no teste (PORROZZI et al., 2007). Além disso, as taxas de especificidade de um teste sorológico para LVC no Brasil podem ser afetadas por outras doenças infecciosas, especialmente leishmaniose tegumentar americana, tripanossomíase (*T. evansi*), doença de Chagas e hemoparasitos (FERREIRA et al., 2007; LAURENTI et al., 2014).

Desde 2012, as campanhas de saúde pública do governo brasileiro utilizam o DPP® como teste de triagem e o ELISA como teste confirmatório para LVC, como parte do “Programa de Controle da Leishmaniose Visceral” (COURA-VITTAL et al., 2014). No entanto, autores têm sugerido que a baixa capacidade do DPP® em diagnosticar animais infectados por *L. infantum* e assintomáticos, o que poderia influenciar diretamente as taxas de sensibilidade do teste e comprometer a eficácia do programa de controle da LV (GRIMALDI Jr. et al., 2012).

Recentemente, um novo sistema de estágios da LVC foi proposto para melhorar o diagnóstico, tratamento, prognóstico e prevenção da doença. Este sistema de estágios clínicos leva em conta os níveis de anticorpos anti-*Leishmania*, sinais clínicos e achados laboratoriais (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Em nosso estudo, todas as amostras de soros identificadas como falso-negativos na RIFI (n=1; 1,7%) e no DPP® (n=4; 6.7%) foram coletadas de cães classificados no estágio I da LVC, que corresponde àqueles animais infectados soronegativos ou com baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania*, ausência ou discreta presença de sinais clínicos no exame físico e ausência de alterações hematobioquímicas.

Na literatura, até onde vai nosso conhecimento, não há nenhum estudo que correlaciona o teste de diagnóstico DPP® com estágios da LVC, sendo encontrados apenas estudos que relacionam o teste com amostras de soros de cães assintomáticos e sintomáticos.

O baixo desempenho do DPP® na identificação dos cães assintomáticos têm sido sugerido por outros autores. Grimaldi Jr. et al. (2012) demonstraram 98,0% de sensibilidade quando o DPP® foi realizado em soro de cães sintomáticos para LVC e esta taxa diminuiu drasticamente em amostras de animais assintomáticos (47,0%).

Nossos resultados, associados aos encontrados na literatura, reforçam a sugestão de que o DPP® apresenta baixa sensibilidade e pior desempenho em comparação a outros testes sorológicos (ELISA e RIFI) que utilizam antígenos brutos, quando aplicados em amostras de soros de cães assintomáticos (GRIMANDI Jr. et al., 2012; LAURENTI et al., 2014).

Mais estudos devem ser conduzidos em animais assintomáticos e no estágio I da LVC, uma vez que, em áreas endêmicas, cerca de 5% a 10% de todos os animais infectados apresentam sinais clínicos enquanto que 90% a 95% apresentam poucos sinais clínicos ou nenhuma manifestação da doença (assintomáticos e estágio I da LVC), por isso é fundamental os testes sorológicos serem sensíveis para detectar animais infectados e saudáveis (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

De maneira geral, nas condições do nosso estudo, o DPP® apresentou boa acurácia (96,66%), VPP (98,24%) e VPN (96,72%), semelhantes aos descritos na literatura (SILVA et al., 2013; LAURENTI et al., 2014). Entretanto esses valores podem sofrer alterações, quando é levada em conta a prevalência da LVC em determinada área. Por isso torna-se necessário estudo multicêntrico em larga escala, abrangendo todas as regiões do país, para o estabelecimento dos valores de acurácia, VPP e VPN mais próximos da realidade em que o teste é aplicado na rotina do “Programa de Controle da Leishmaniose Visceral do Brasil”.

Em relação à sensibilidade e especificidade do DPP®, ELISA-*in house* e RIFI-*in house*, nossos resultados permitem sugerir que o teste rápido deveria ser utilizado como diagnóstico confirmatório, porque possui melhor especificidade que o ELISA, que seria aplicado como teste de triagem, em razão da sua de sua melhor sensibilidade, em um cenário ideal de inquérito sorológico na saúde pública. A literatura tem apresentado resultados semelhantes e a recomendação de aplicação do DPP® como confirmatório e ELISA como triagem nos inquéritos para LVC (LAURENTI et al., 2014).

O uso do DPP® como confirmatório e ELISA como teste de triagem pela saúde pública poderia prevenir a eliminação de cães falso-positivos para LVC e diminuir o número de animais falso-negativos que permanecem no ambiente, contribuindo para manutenção da prevalência da LV e LVC em áreas endêmicas.

Poucos estudos têm sido realizados para avaliar o desempenho do DPP® em soros de cães com outras doenças infecciosas, como as causadas por

hemoparasitos. Nossos resultados demonstraram que o DPP® foi positivo em apenas um cão co-infectado com *Ehrlichia canis* + *Babesia canis* (2,17%). O ELISA foi positivo em 17,4% de soros de cães infectados com hemoparasitos. Destes, seis amostras foram coletadas de cães infectados com *Ehrlichia canis* e dois com *Hepatozoon canis*. Em estudo realizado por Laurenti et al. (2014,) o DPP® apresentou-se positivo em 04/63 (6,3%) amostras de soros de cães com babesiose.

Zanette et al. (2014) realizaram um estudo com 57 amostras de soros de cães com hemoparasitoses. Destes, 14 estavam infectados por *Trypanosoma cruzi*, 12 por *Babesia canis*, 13 *Ehrlichia canis*, 10 por *Toxoplasma gondii* e oito por *Neospora caninum*. O objetivo foi avaliar a reação cruzada de testes sorológicos (ELISA, RIFI, *Kalazar Detect*™) entre *Leishmania* e outros parasitas de cães. No ensaio de ELISA, 09/14 amostras de soros com *T. cruzi* e 01/13 amostras de cães infectados por *B. canis* foram positivos. Na RIFI, 05/10 amostras de soros de cães com *T. gondii* foram positivas. No teste rápido *Kalazar Detect*™ (rK39), 01/13 amostras com *E. canis*, 01/10 com *T. gondii* e 01/08 com *N. caninum*, foram positivas. Os autores relatam que a presença de outras infecções nos cães pode levar a reatividade cruzada com *Leishmania* nos testes de diagnóstico sorológicos para LVC.

Como observado na literatura, os testes de sorodiagnóstico da LVC podem apresentar reação cruzada com outros parasitos comuns de cães, e por isso é necessário o emprego de outras técnicas de diagnóstico em associação com as sorológicas, como as moleculares que são mais sensíveis, para melhorar a acurácia do diagnóstico, minimizando a freqüência de resultados falso-positivos causados pela reatividade cruzada entre *Leishmania* e hemoparasitos (ALVAR et al., 2004; FERREIRA et al., 2007; LAURENTI et al., 2014).

Em nosso estudo não foi possível realizar a Reação em Cadeia de Polimerase em amostras dos animais infectados com hemoparasitos, pela indisponibilidade de coleta de material para obtenção de DNA (aspirado de medula óssea). Ainda assim acreditamos que nossos resultados são importantes e válidos, uma vez que a freqüência de positividade nas amostras de cães com hemoparasitoses e de área não-endêmica foram semelhantes e, mais ainda, o valor de especificidade que encontramos está de acordo com aqueles relatados na literatura.

Além disso, um dos objetivos do nosso grupo foi avaliar o desempenho do DPP® em soros de cães provenientes de área com baixa prevalência para LVC e alta para hemoparasitos, uma vez que este cenário é comum na rotina clínica de várias cidades do país, como por exemplo, Uberlândia (MG).

O melhor desempenho do DPP® em relação ao ELISA, quando comparadas as taxas de positividade nas amostras de cães negativos para LVC e infectados com hemoparasitos poderia ser explicado pelo tipo de antígeno utilizado em cada técnica (GRIMALDI Jr. et al., 2012; PORROZZI et al., 2007).

O DPP® é um teste imunocromatográfico baseado em partículas de ouro coloidal que utilizada proteína recombinante (GRIMALDI Jr. et al., 2012). O uso de proteínas recombinantes nos testes sorológicos para LVC é uma boa estratégia, porque elas são altamente específicas no reconhecimento de anticorpos anti-*Leishmania* e apresentam baixas taxas de resultados falso-positivos (GRIMAILDI Jr. et al., 2012; LAURENTI et al., 2014). Por outro lado, os ensaios de ELISA e RIFI avaliados neste trabalho são baseados no antígeno bruto de *L. infantum*, que pode apresentar maior reatividade cruzada com outros parasitos comuns de cães, quando comparados com antígenos de proteínas recombinantes como sugerido pela literatura (FERREIRA et al., 2007; ROSÁRIO et al., 2005).

Quinnell et al. (2013) analisaram o desempenho de um teste rápido (*Kalazar Detect Canine Rapid Test* - RDT) que utiliza como antígeno a proteína K39, em 54 amostras de soros de cães naturalmente infectados por *Leishmania* de área endêmica para LVC no Brasil. Eles compararam o teste RDT com ELISA e PCR. O teste de ELISA foi realizado com antígeno bruto. Os autores relatam que a resposta de anticorpos anti-*Leishmania* ao antígeno recombinante (rK39) são mais lentas quando comparados com a resposta ao antígeno bruto de *Leishmania* e o melhor desempenho do teste rápido foi em amostras de soros de animais com infecção grave (sintomáticos).

Peixoto, Oliveira e Romero (2015) realizaram uma revisão sistemática sobre os testes sorológicos de RIFI, ELISA e DPP®. O objetivo do estudo foi avaliar a qualidade e acurácia do diagnóstico sorológico da LVC nas Américas. Os autores utilizaram 284 trabalhos selecionados no Medline, Embase e Lilacs entre novembro de 2012 a fevereiro de 2013. Destes, 25 se enquadram nos critérios de inclusão, cujo objetivo foi minimizar vieses que poderiam influenciar nos valores de

sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos para LVC. Dos 25 trabalhos selecionados, apenas três avaliaram o desempenho do teste DPP®. A partir desses dados os autores calcularam os valores de sensibilidade e especificidade dos testes. A RIFI apresentou 88% de sensibilidade e 63% de especificidade; ELISA 89% de sensibilidade e 87% de especificidade e o DPP® apresentou sensibilidade de 83% e especificidade de 73%. O ensaio de ELISA com antígeno bruto e o DPP® demonstraram acurácia moderada no diagnóstico da LVC. Baseado nesses valores, os autores sugerem que a real prevalência de cães infectados por *Leishmania* em área endêmica pode ser subestimada, dependendo da sensibilidade e especificidade do teste de diagnóstico utilizado nessas áreas, bem como a escolha correta do teste de padrão-ouro na identificação dos animais doentes (PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMERO, 2015).

A baixa sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos utilizados tanto na saúde pública, quanto nos laboratórios privados para o sorodiagnóstico de LVC, aponta para uma preocupação especial em relação à eliminação de cães falso-positivos, porque não há testes 100% sensíveis e específicos para uso rotineiro. Por isso, testes sorológicos para LVC poderiam ser usados em combinação com outras técnicas, como PCR específica e imuno-histoquímica, especialmente em regiões endêmicas para leishmaniose tegumentar americana, tripanossomíase, doença de Chagas, babesiose, erlichiose, hepatozoonose, neosporose e toxoplasmose.

A discussão sobre a eliminação em massa dos cães soropositivos como medida de controle da LV, adotada pela saúde pública do governo brasileiro, está longe de acabar, portanto boa acurácia, sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos para LVC são de extrema importância, sendo necessário especial atenção no diagnóstico dos animais assintomáticos e no estágio I da LVC (PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMERO, 2015).

No nosso estudo os resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia demonstrados pelo DPP® suportam seu uso no diagnóstico sorológico da LVC. Entretanto, apesar do desempenho satisfatório, o teste não foi capaz de identificar todos os cães classificados no estágio I da LVC. Além disso, o teste foi positivo em amostra de cão co-infectado com *Ehrlichia* e *Babesia*, sugerindo resultado falso positivo por reação cruzada.

Quando comparado com ELISA e RIFI que utilizam antígeno bruto de *L. infantum*, o DPP® apresentou sensibilidade inferior e especificidade superior, corroborando a recomendação do seu uso como teste confirmatório, ao invés de ferramenta de triagem nos inquéritos da saúde pública, para o diagnóstico da LVC. Mais estudos, preferencialmente multicêntricos, são necessários para verificar o desempenho do DPP®, utilizando maior número de cães assintomáticos, nos diferentes estágios clínicos da LVC, e com outras doenças infecciosas.

O desenvolvimento de testes de diagnóstico para LVC eficazes para identificar cães sintomáticos, assintomáticos, e que não produzam reação cruzada com outras doenças, além de minimizar a eliminação de cães falso-positivos e manutenção de falso-negativos no meio, é de grande importância para a saúde pública, refletindo diretamente no controle da doença, especialmente em áreas endêmicas da LV.

## 8 Conclusões

- O DPP® *Dual Path Platform* (Bio-Manguinhos/Fiocruz, Brasil) apresentou melhor desempenho de especificidade em relação ao RIFI *in-house* e ELISA *in-house*, e pior sensibilidade em relação aos dois testes.
- O teste de DPP® apresentou melhor sensibilidade para diagnosticar cães classificados no estágio II e III do que em animais classificados como estágio I da LVC.
- O teste DPP® apresentou maior especificidade em relação aos testes RIFI *in-house* e ELISA *in-house* em cães soronegativos para LVC e infectados por hemoparasitos.
- Os testes DPP®, RIFI *in-house* e ELISA *in-house*, demonstraram bons parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina e o DPP® apresentou melhor valor de acurácia em relação aos dois testes.

## Referências Bibliográficas

- AGUIRRE, E.; TESOURO, M.A.; RUIZ, L.; AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A. Genetic Characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in Dogs in Spain. **Journal Veterinary Medicine**, v. 53, p. 197–200, 2006.
- ALMEIDA, M. A.; JESUS, E. E.; SOUSA-ATTA, M. L. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n.3-4, p. 227-32, 2005.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitology**, v. 22, p. 552-557, 2006.
- AMORIM, I. F. G.; DA SILVA, S. M.; FIGUEIREDO, M. M.; MOURA, E. P.; CASTRO, R. S.; LIMA, T. K. S.; GONTIJO, N. F.; MICHALICK, M. S. M.; GOLLOB, K. J.; TAFURI, W. L. Toll Receptors Type-2 and CR3 Expression of Canine Monocytes and Its Correlation with Immunohistochemistry and Xenodiagnosis in Visceral Leishmaniasis. **Plos One**, v. 6, e27679, 2011.
- AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRIGUEZ, F.; TESOURO, M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of Epidemiology**, v. 18, p. 147-156, 2003.
- ANDRADE, R.V.; MASSONE, C.; LUCENA, M.N.B.; TALHARI, A.C.; TALHARI, S.; GUERRA, J.A.O.; FERREIRA, L.C.L. The use of polymerase chain reaction to confirm diagnosis in skin biopsies consistent with american tegumentary leishmaniasis at histopathology: a study of 90 cases. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 5, 2011.
- ANDRADE, H.M.; TOLEDO, V.P.; PINHEIRO, M.B.; GUIMARÃES, T.M.; OLIVEIRA, N.C.; CASTRO, J.A.; SILVA, R.N.; AMORIM, A.C.; BRANDÃO, R.M.; YOKO, M.; SILVA, A.S.; DUMONT, K.; RIBEIRO, M.L.; BARTCHEWSKY, W.; MONTE, S.J. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (=*L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, 2012.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEG, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Veterinary Parasitology**, v. 24, p. 324-330, 2008.
- BARBOSA, D. S.; ROCHA, A. L.; SANTANA, A. A.; SOUZA, C. S. F.; DIAS, R. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; ABREU-SILVA, A. L. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 635-659, 2010.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n.10, p.1097-1106, 2007.

BREITSCHWERDT, E. B. The Rickettsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do Cão e do Gato. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 422-429, 2004.

BONFANTI, U.; ZINI, E.; MINETTI, E.; ZATELLI, A. Free light-chain proteinuria and normal renal histopathology and function in 11 dogs exposed to *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, and *Babesia canis*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, p. 618-624, 2004.

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 10, p. 143-171, 1974.

CASTRO, M.B.; MACHADO, R.Z.; AQUINO, L.P.; ALESSI, A.C.; COSTA, M.T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 873-882, 2007.

COSTA, C. H.; VIEIRA, J. B. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropica**, v. 34, p. 223-228, 2001.

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

COSTA, L. M.; ZAHLER-RINDER, M.; RIBEIRO, M. F.; REMBECK, K.; RABELO, E. M.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. Use of a Real Time PCR for detecting subspecies of *Babesia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 160-163, 2012.

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

COURA-VITAL, W.; KER, H. G.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; LEAL, G. G. A.; MOREIRA, N. D.; OLIVEIRA, L. A. M.; MACHADO, E. M. M.; MORAIS, M. H. F.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B. Evaluation of Change in Canine Diagnosis Protocol Adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a New Proposal for Diagnosis. **Plos One**, v. 9, n. 3, e91009, 2014.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1314-20, 2002.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 173-185, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 48, n. 3, 2006.

DAVID, J. R.; STAMM, L. M.; BEZERRA, H. S.; SOUZA, R. N.; KILLICK-KENDRICK, R.; LIMA, J. W. O. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent antifeeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 839-847, 2001.

DEANE, L. M. Leishmaniose visceral no Brasil – estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará, sanitária, S.n.d.e., ed. Rio de Janeiro, p. 161, 1956.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, p. 1240-2, 1997.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, p. 125-130, 1996.

FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. B.; PORROZZI, R.; DA COSTA, M. V.; TEVA, A. B. Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of Southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 559-65, 2009.

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

FERREIRA, E. C.; LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; SILVA, E. S.; SCHALLIG, 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.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. **Canine Leishmaniasis: an update**. s.n: 6-10, 1999.

FOGLIA MANZILLO, V.; OLIVA, G.; PAGANO, A.; MANNA, L.; MAROLI, M.; GRADONI, L. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical

outcome of Leishmania infection in kennelled stray dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 142-145, 2006.

FRANCA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, G. L.; DA COSTA, C. A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E. P.; COSTA, J. S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 2-3, p.161-173, 2003.

GAVGANI, A. S.; HODJATI, M. H.; MOHITE, H.; DAVIES, C. R. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. **Lancet**, v. 360, p. 374-379, 2002.

GOMES, Y. M.; CAVALCANTI, M. P.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G.; 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, p. 338-349, 2004.

GRIMALDI, J. R. G.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. B.; PINTO, I. S.; DE AZEVEDO, C. T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP((R)) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 54–59, 2012.

HERWANDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

KAMANI, J.; BANETH, G.; MUMCUOGLU, K.Y.; WAZIRI, N.E.; EYAL, O.; GUTHMANN, Y.; HARRU, S. Molecular Detection and Characterization of Tick-borne Pathogens in Dogs and Ticks from Nigeria. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, e2108, 2013.

KARAGENC, T. I.; PASA, S.; KIRLI, G.; HOSGOR, M.; BILGIC, H.B.; OZON, Y. H.; ATASOY, A.; EREN, H. A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean Coast of Turkey. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 113-119, 2006.

KEMMING, G. I.; MESSICK, J. B.; ENDERS, J.; BOROS, M.; LORENZ,B.; MUENZING, S.; KISCH-WEDEL, H.; MUELLER, W.; HAHMANN-MUELLER, A.; MESSMER, K.; THEIN, E. *Mycoplasma haemocanis* Infection— A Kennel Disease? Comparative Medicine. **American Association for Laboratory Animal Science**, v. 54, n. 4, p. 404-409, 2004.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, p. 376–383, 1999.

KOUTINAS, A.F.; CARLOTTI, D.N.; KOUTINAS, C.; PAPADOGIANNAKIS, E.I.; SPANAKOS, G.K.; SARIDOMICHELAKIS, M.N. Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with *Leishmania infantum*. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 572-577, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis. In Cox FEG, Wakelin D., Gillespie SH, Despommier DD. Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, Parasitology, 10 th ed., ASM Press, London, 313-349.

LAURENTI, M. D.; DE SANTANA, L. J. R.; TOMOKANE, T. Y.; DE LUCCA, H. R. L.; ASCHAR, M.; SOUZA, C. S. F.; SILVA, R. M.; MARCONDES, M.; DE MATTA, V. L. R. Comparative evaluation of the DPP®CVL rapid test for canineserodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 444–450, 2014.

LI, Y.; WANG, C.; ALLEN, K. E.; LITTLE, S. E; AHLUWALIA, S. K.; GAO, D.; MACINTIRE, D. K.; BLAGBRUN, B. L.; KALTENBOECK, B. Diagnosis of canine *Hepatozoon* spp. Infection by quantitative PCR. **Veterinay Parasitology**, v. 157, p. 50-58, 2008.

LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S.; MELO, M. N.; TAFURI, L. W. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, v. 92, p. 43-53, 2004.

LIMA, V.M.F.;FATTORI, K.R.; MICHELIN, A.F.; NETO, L.S.; VASCONCELOS, R.O. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, vol.173, p.330-333, 2010.

LITTLE, S. E. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America:Small Animal Practice**,v. 40, n.6, p. 121-40, 2010.

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

MARCONDES, M.; BIONDO, A.W.; GOMES, A. A. D.; SILVA, A. R. S.; VIEIRA, R. F. C.; CAMACHO, A. A.; JOHN QUINN, C. R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 15–19, 2011.

MAROLI, M.; MIZZONI, V.; IRAGUSA, C. S.; D'ORAZI, A.; GRADON, L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin impregnated dog collars in southern Italy. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 15, p. 358-363, 2001.

MAURICIO, I.L.; GAUNT, M.W.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology**, v. 122, p. 393-403, 2001.

MESSICK, J.B. New perspectives about Hemotropic mycoplasma (formely, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. **The**

**Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n.6, p. 1453-1465, 2003.

MESSICK, J. B. Hemotrophic mycoplasmas (haemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 2-13, 2004.

MIRÓ, G.; GÁLVEZ, R.; MATEO, M.; MONTOYA, A.; DESCALZO, M. A.; MOLINA, R. Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 375-379, 2007.

MOREIRA, S. M.; MACHADO, R. Z.; PASSOS, L. F. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 958-960, 2005.

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

O'DWYER, L. H. Brazilian canine hepatozoonosis Hepatozoonose canina brasileira. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 181-193, 2011.

PEÑA, M. T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M. G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). **Veterinary Ophthalmology**, v. 3, p. 35-41, 2000.

PORROZZI, R.; COSTA, M. V. S.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; SANTOS, C. D. S.; FERNANDES, A. P.; GAZZINELLI, R. T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, J. R. 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. **Clinical and vaccine immunology**, v. 544-548, 2007.

RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F. R.; SOUZA, I.; PIMENTEL, D. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitol Research**, v. 107, n. 5, p. 1115-1120, 2010.

REITHINGER, R.; COLEMAN, P. G.; ALEXANDER, B.; VIEIRA, E. P.; ASSIS, G.; DAVIES, C. R. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 55-62, 2004.

ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America – a systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, e584, 2010.

ROSÁRIO, E. Y.; GENARO, O.; FRANCA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 2, p. 197-203, 2005.

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; FREITAS, L. A.; OLIVEIRA, G. G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; DOS-SANTOS, W. L. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v.30, p. 515-524, 2008.

SANTIS, B.; SANTOS, E. G. B.; SOUZA, C. D. F.; CHAVES, S. A. M. Performance of DPP™ immunochromatographic rapid test (IRT) for canine visceral leishmaniasis: comparison with other serological methods in suspected dogs from Cuiabá, Mato Grosso State, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.50, n. 3, p. 198-205, 2013.

SAUQUILLO, M. C. T. La Leishmaniosis canina. 2a Parte. Manifestaciones oculares em la leishmaniosis canina. **Rev Ofic Con Gen Col Vet España**, p. 9-43, 2005.

SILVA, A. V.; PAULA, A. A.; CABRERA, M. A.; CARREIRA, J. C. Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, p. 324-328, 2005.

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

SILVA, J. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BOA SORTE, V. C.; FREITAS, A. G.; SANTOS, L. G. F.; AGUIAR, D. M.; SOUSA, V. R. F. Soroprevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães em Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19 n.2, p.108-111, 2010.

SILVA, M.; RIBEIRO, V. M.; RIBEIRO, R. R.; TAFURI, W. N., MICHALICK, M. S. First report of vertical transmission of Leishmania (Leishmania) infantum in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 159–162, 2009.

SILVA, S. M.; AMORIM, I. F. G.; RIBEIRO, R. R.; AZEVEDO, E. G.; DEMICHELI, C.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; GONTIJO, N. F.; MICHALICK, M. S. M. FRÉZARD, F. Efficacy of Combined Therapy with Liposome-Encapsulated Meglumine Antimoniate and Allopurinol in Treatment of Canine Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 2858 –2867, 2012.

SMITH, T.G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). **Journal of Parasitology**, v.82, p. 565-585, 1996.

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 leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 65, p. 1–18, 2009.

TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; AMUDE, A.M.; MORAIS, H.S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 223–230, 2006.

VOLLER, A. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (theory, technique and applications). *La Ricerca in Clinica e in Laboratorio*, v. 8, p. 289–298, 1979.

ZANETTE, M. F.; DE LIMA, V. M. F.; LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; VIDES, J. P.; VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W.; MARCONDES, M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. In: WHO Technical Report Series, n. 949. ed. Genebra, World Health Organization, 2010.

**ANEXO 1**

Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa

Mônica - Uberlândia-MG –

CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;

[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

**ANÁLISE FINAL Nº 039/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE  
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 010/13**

Projeto Pesquisa: "Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina em Uberlândia, Minas Gerais Brasil".

Pesquisador Responsável: Sydnei Magno da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

**SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.**

**OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.**

Uberlândia, 25 de Fevereiro de 2013

Prof. Dr. César Augusto Garcia  
Coordenador da CEUA/UFU

## ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 211/2007**, relativo ao projeto intitulado "*Avaliação imunológica e histopatológica de cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi, tratados com antimoniate de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos e allopurinol*", que tem como responsável **Wagner Luiz Tafuri**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **12/ 03/2008**.

Este certificado expira-se em **12/ 03 / 2013**.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 211/2007**, related to the project entitled "*Immunological and histopathological evaluation of dogs with visceral leishmaniasis submitted to treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol*", under the supervision of **Wagner Luiz Tafuri**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 12, 2008**.

This certificate expires in **March 12, 2013**.

Belo Horizonte, 28 de Março de 2008.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Coordenador do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2006  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@proq.ufmg.br](mailto:cetea@proq.ufmg.br)

(Mod.Cert. v1.0)