



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO



AVALIAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA UV-Vis
ASSOCIADA AO APRENDIZADO DE MÁQUINA PARA
DIAGNÓSTICO DE *Leishmania infantum* EM CÃES

LETÍCIA BORGES SEIDENFUSS ANTUNES

Campo Grande – MS
2025

LETÍCIA BORGES SEIDENFUSS ANTUNES

**AVALIAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA UV-Vis ASSOCIADA
AO APRENDIZADO DE MÁQUINA PARA DIAGNÓSTICO
DE *Leishmania infantum* EM CÃES**

*Evaluation of UV-vis spectroscopy associated with learning machine for
diagnosis of Leishmania infantum in dogs*

**LETÍCIA BORGES SEIDENFUSS
ANTUNES**

**ORIENTADOR: CARLOS ALBERTO
DO NASCIMENTO RAMOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias da
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de Mestre em
Ciências Veterinárias.

Campo Grande – MS

2025

Inserir Folha de Aprovação assinada

SUMÁRIO

Resumo.....	8
Abstract	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. Introdução	10
2.2. Transmissão e ciclo biológico.....	11
2.3. Sinais clínicos	12
2.4. Diagnóstico	13
2.4.1 Diagnóstico parasitológico	15
2.4.2 Diagnóstico imunológico	15
2.4.2.1 Teste imunocromatográfico rápido	16
2.4.2.2 Ensaio Imunoenzimático - ELISA	17
2.4.2.3 Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI.....	18
2.4.3 Imuno-histoquímica	19
2.4.4 Diagnóstico molecular	19
2.4.4.1 PCR convencional	20
2.4.4.2 PCR em tempo real - qPCR.....	21
2.5 Espectroscopia UV-vis	21
3. OBJETIVO.....	23
3.1 Objetivos Específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Seleção das Amostras.....	23
4.2 Coleta dos Espectros UV-Vis e Análise de Dados.....	24
5. RESULTADOS.....	25
6. DISCUSSÃO	31

7. CONCLUSÕES	36
8. REFERÊNCIAS	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Espectros médios de soro canino obtidos por espectroscopia UV-Vis com pré-processamento SNV, para os grupos positivos e negativos para *Leishmania* e *Ehrlichia*. A sombra colorida ao redor de cada linha representa o desvio padrão, indicando a dispersão dentro de cada grupo..... 26
- Figura 2. Análise de Componentes Principais (PCA) dos espectros de absorvância UV-Vis de soro canino, após pré-processamento SNV. À esquerda, gráfico de escores representando a distribuição das amostras nos dois primeiros componentes principais: PC1 (70,7%) e PC2 (25,3%). À direita, gráficos de loadings de PC1 e PC2..... 27
- Figura 3 Acurácia (%) obtida pela aplicação do modelo de Support Vector Machine (SVM) com diferentes funções de kernel Linear (a) Quadrática (b) e Cúbica (c) sobre os espectros de soro canino pré-processados por Standard Normal Variate (SNV). Foram testados três valores de parâmetro de regularização C (1, 10 e 100) para cada kernel. Os gráficos apresentam as curvas de acurácia para os conjuntos de treinamento e teste em cada combinação de kernel e parâmetro 28
- Figura 4 Matriz de confusão do modelo SVM Quadrático (C=1) aplicado ao conjunto com quatro classes (LNEN, LNEP, LPEN e LPEP). A primeira matriz refere-se ao conjunto de treino (acurácia de 42,9%) e a segunda ao conjunto de teste (acurácia de 47,2%). Os valores expressos correspondem a proporção (%) de amostras corretamente ou incorretamente classificadas em cada classe. Observa-se maior sensibilidade na classe LNEP, enquanto as classes LNEN, LPEN e LPEP apresentaram maior taxa de confusão, especialmente no conjunto de treino 29
- Figura 5 Matriz de confusão obtidas na etapa de treino (à esquerda) e teste (à direita) para classificação binária entre as classes (LNEN) e (LPEN), utilizando a Análise Discriminante Quadrática (QDA). No conjunto de treino, observou-se acurácia de 64,3% com sensibilidade de 85,7% para LNEN e 42,9% para LPEN. No conjunto de teste, a acurácia foi de 61,1%, sendo a sensibilidade de 100% para LNEN e 22,2% para LPEN 30

Figura 6 Matriz de confusão obtida na etapa de treino (à esquerda) e teste (à direita) para classificação binária entre as classes (LNEN) e (LNEP), utilizando Análise Discriminante Quadrática (QDA). No conjunto de treino, observou-se acurácia de 82,1%, com sensibilidade de 78,6% para LNEN e 85,7% para LNEP. No conjunto teste, a acurácia foi de 77,8%, sendo a sensibilidade de 66,7% para LNEN e 88,9% para LNEP 31

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Classificação de cães quanto a exposição, infecção e doença. Quadro adaptado de Brasileish (2018)	12
Tabela 1. Resumo dos cenários avaliados na classificação dos grupos sorológicos, considerando diferentes combinações de classes. São apresentados os valores de acurácia nos conjuntos de treino e teste, bem como observações relevantes relacionadas ao desempenho dos modelos e a separação entre os grupos, com base também nos resultados da PCA ...	35

Resumo

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC), é uma doença grave causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, transmitida por artrópodes do gênero *Lutzomyia*. Trata-se de uma zoonose de grande importância, e os animais acometidos podem apresentar sinais clínicos como emagrecimento, fraqueza, febre intermitente, e problemas renais e hepáticos. O diagnóstico definitivo da leishmaniose ainda é pouco preciso, pois existem similaridades com outras enfermidades. As técnicas recomendadas atualmente pelo ministério da saúde para diagnóstico em cães são o teste rápido imunocromatográfico e o ensaio imunoenzimático (ELISA), que embora sejam extensivamente utilizadas, ainda apresentam problemas associados a sensibilidade e especificidade. Atualmente, técnicas de espectroscopia óptica associada a análises baseadas em aprendizado de máquina, vem sendo estudadas para diagnóstico de infecção por diversos patógenos, inclusive a *L. infantum*. A espectroscopia é uma metodologia de fácil acesso, custo baixo, e tem apresentado bons resultados na diferenciação de amostras positivas e negativas para *Brucella*, *Leishmania*, entre outros. No entanto, até o presente momento, a maioria dos estudos têm realizado comparações dicotômicas (infetado x não infectado), deixando dúvidas quanto a real capacidade da metodologia em determinar uma infecção em específico. Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar de forma mais detalhada a metodologia de diagnóstico sorológico de *L. infantum* baseada na espectroscopia UV-Vis e aprendizado de máquina, não apenas quanto a capacidade de diferenciação de amostras positivas e negativas para *L. infantum*, mas também, co-infecções e amostras positivas para outros agentes infecciosos comuns em cães tais qual *Ehrlichia canis*. Os resultados obtidos indicam que a co-infecção por *Ehrlichia* dificultou a identificação precisa dos animais infectados e não infectados por *Leishmania* (acurácia inferior a 50%). No entanto, observou-se boa capacidade discriminatória na distinção entre amostras positivas e negativas para *E. canis* (acurácia de 77,8%). Será necessário ampliar o banco de dados para análise, e implementar ajustes dos parâmetros e métodos de aprendizado de máquina para melhorar a capacidade discriminatória da metodologia e torná-la viável como método de diagnóstico.

Palavras-chave: Leishmaniose, espectroscopia, diagnóstico.

Abstract

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a severe disease caused by the protozoan *Leishmania infantum*, transmitted by arthropods of the genus *Lutzomyia*. It is a zoonosis of major importance, and affected animals may present clinical signs such as weight loss, weakness, intermittent fever, and renal and hepatic impairment. The definitive diagnosis of leishmaniasis remains imprecise, since it shares similarities with other diseases. The diagnostic techniques currently recommended by the Ministry of Health of Brazil, for dogs, are the immunochromatographic rapid test and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which, although widely used, still present issues related to sensitivity and specificity. Currently, optical spectroscopy techniques combined with machine learning-based analyses have been investigated for the diagnosis of infections caused by various pathogens, including *L. infantum*. Spectroscopy is an accessible and low-cost methodology, and has shown promising results in differentiating positive and negative samples for *Brucella*, *Leishmania*, among others. However, to date, most studies have relied on dichotomous comparisons (infected vs. non-infected), leaving uncertainties regarding the actual ability of the methodology to determine a specific infection. In this context, the present study aimed to evaluate in greater detail the serological diagnostic methodology of *L. infantum* based on UV-Vis spectroscopy and machine learning, not only in terms of its ability to differentiate positive and negative samples for *L. infantum*, but also to assess co-infections and samples positive for other common infectious agents in dogs, such as *Ehrlichia canis*. The results obtained indicate that co-infection with *Ehrlichia* hampered the accurate identification of animals infected and non-infected with *Leishmania* (accuracy below 50%). Nevertheless, good discriminatory capacity was observed in distinguishing positive and negative samples for *E. canis* (accuracy of 77.8%). Expanding the dataset and implementing parameter adjustments and machine learning methods will be necessary to improve the discriminatory ability of the methodology and make it feasible as a diagnostic tool.

Keywords: Leishmaniasis, spectroscopy, diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses podem ser classificadas como visceral (a mais grave), cutânea, cutânea difusa e mucocutânea, sendo considerada um problema de saúde pública em países em desenvolvimento, os quais apresentam cerca de 12 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões em risco de infecção. Anualmente, cerca de 50.000 a 90.000 novos casos são registrados (OMS, 2021; ULIANA et al. 2021).

Mais de 70 espécies animais são consideradas hospedeiros naturais do gênero *Leishmania spp.*, e entre eles, os cães são os que possuem maior proximidade com o ser humano, pois além de atuar como reservatórios nas áreas urbanas, servem como elo entre o ciclo silvestre e o ciclo urbano. Logo, o diagnóstico e controle da doença nos cães são importantes medidas para o controle da mesma, e a adoção de métodos diagnósticos de alta sensibilidade e especificidade se tornam cruciais (OMS, 2021; ULIANA et al. 2021).

Particularmente, a leishmaniose visceral canina (LVC), também chamada de calazar, é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e transmitida através do repasto sanguíneo por flebotomíneos, como o mosquito-palha, grupo de insetos pertencentes à ordem díptera, subordem Nematocera, família Psychididae. A espécie *Lutzomyia longipalpis* é considerado o mais importante vetor de *L. infantum* no Brasil (URQHART, 1998; TAYLOR et al., 2016).

Apesar de existirem vários métodos disponíveis para o diagnóstico da doença, a dificuldade no diagnóstico ainda existe, seja por limitações de procedimentos necessários ao diagnóstico ou por baixa especificidade e ou sensibilidade dos testes (PERINOTO, 2010). Tal dificuldade em um diagnóstico prévio pode acarretar dificuldades no tratamento e controle e ainda facilitar o avanço e disseminação da doença. E como alternativa para contornar essa dificuldade, vê-se a necessidade de combinar mais de um método diagnóstico, seja ele sorológico, parasitológico ou molecular. Mas tal abordagem pode ser inviável, principalmente em grandes populações ou regiões menos desenvolvidas economicamente (BOWMAN, 2010).

Pesquisas envolvendo o diagnóstico de doenças, convergem para a busca de inovações que facilitem a obtenção de resultados precisos aliados a métodos não invasivos, além de possibilitar tempo inferior aos métodos tradicionais. Com

isso, a espectroscopia vem se destacando por apresentar-se como uma ferramenta de diagnóstico preciso e seletivo para diversas infecções. A espectroscopia UV-Vis, em particular, permite a detecção de alterações bioquímicas nos fluídos biológicos, desprezando o uso de equipamentos dispendiosos, técnicas complexas e um longo período de espera dos resultados. No entanto, por se tratar de dados complexos e com respostas sobrepostas, a análise destes dados não é trivial (PEPE et al., 2001; ETZIONI et al., 2003; GARNETT et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2022).

Dessa forma, e utilizando os métodos de imunocromatografia e ELISA como testes confirmatórios para LVC, o presente estudo propõe avaliar o desenvolvimento de uma metodologia diagnóstica simples, rápida e de baixo custo, fundamentada na espectroscopia UV-Vis associada ao aprendizado de máquina. Além de avaliar a capacidade deste método distinguir as infecções por *L. infantum* de outras infecções, tal qual a erliquiose canina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Introdução

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma antropozoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, cujo o agente etiológico é transmitido através da picada de flebotomíneos vetores (ABBIATI et al., 2019). No Brasil, *L. infantum* apresenta como vetor duas espécies de flebotomíneos: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, conhecido como mosquito-palha, que normalmente se reproduz em locais com matéria orgânica em decomposição (MAIA, 2013; SILVA et al., 2017; NISHIDA E DELMASCHIO, 2017; LIMA E GRISOTTIB, 2018). Ademais, outras espécies também são reconhecidas como responsáveis pela transmissão dos protozoários em outros países, como a *Nyssomyia* sp., *Psychodopygus* sp. e *Phlebotomus* sp. nas Américas – incluso Brasil, sendo este último gênero vetor principal na Europa, Ásia e África (ULIANA et al., 2021; KAMETIUK et al., 2022).

A LVC é uma das zoonoses consideradas mais importantes por se tratar de uma doença severa e fatal para os cães. Estes animais atuam como reservatórios do protozoário, facilitando a disseminação da doença em ambientes urbanos e periurbanos (ABRANTES et al., 2018). Sendo assim, o reservatório tem um papel fundamental na expansão da enfermidade principalmente nas regiões

consideradas endêmicas, além de estar fortemente associado à incidência da doença em humanos (MACHADO et al., 2016).

Considerada crônica e sistêmica, essa doença acomete múltiplos órgãos e tecidos como baço, fígado e medula óssea, causando alterações clínicas muito variáveis por entre os indivíduos infectados. O diagnóstico precoce é dificultado devido as diferentes respostas imunológicas desenvolvidas nos hospedeiros e do longo período de incubação, podendo variar de meses a anos, além da possibilidade de coinfeções com outros patógenos (PALATNIK-DE-SOUSA E DAY, 2011; OPS, 2019).

2.2. Transmissão e ciclo biológico

A transmissão da *L. infatum* ocorre durante o repasto sanguíneo do flebotômíneo em um vertebrado infectado, no qual o vetor ingere os macrófagos parasitados com formas amastigotas de *Leishmania* spp. No trato digestório do vetor, ocorrerá uma fissão binária, multiplicação e diferenciação para forma promastigota, onde irão colonizar o esôfago e a faringe do vetor e ficarão aderidas ao epitélio pelo flagelo e lá irão se diferenciar em promastigotas metacíclicas (formas infectantes) fagocitário (IKEDA-GARCIA E MARCONDES, 2007; STOCKHAM E SCOTT, 2011).

O ciclo estará completo com a picada do flebótomo infectado e posterior inoculação de formas promastigotas na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. No interior do macrófago irão se diferenciar em formas amastigotas que se multiplicarão por divisão binária. Os macrófagos, agora repletos de amastigotas, se tornam desvitalizados e rompem-se liberando essas formas, onde serão fagocitadas por um novo macrófago. Assim, ocorre a disseminação hematogênica e linfática para outros tecidos, além de que por ser um parasito intracelular obrigatório, e por razão do sistema imune ser dependente dessas células parasitadas, haverá a redução da defesa tendo em vista que a multiplicação do parasito promove o rompimento celular (IKEDA-GARCIA E MARCONDES, 2007; BRASIL, 2014).

2.3. Sinais clínicos

Nem todos os animais infectados apresentarão sinais clínicos, pois a imunocompetência do hospedeiro influencia a forma de apresentação clínica da LVC. Dessa forma, a manifestação pode ocorrer de maneira assintomática, ou sintomática (BRASIL, 2014).

Por se tratar de uma doença de caráter sistêmico e crônico, a LVC afeta tecido cutâneo e vísceras. Os cães podem não apresentar nenhum sinal aparente, porém quando sintomáticos comumente apresentam mais de um sinal clínico, podendo ainda serem colocados em quatro classes, levando em conta a exposição, infecção e doença (Quadro 1) (MAIA, 2013; ALVES et al., 2015, BRASILEISH, 2018).

Quadro 1. Classificação de cães quanto a exposição, infecção e doença. Quadro adaptado de Brasileish (2018).

Classificação	Características
Não infectado sadio	Assintomático, sem alterações laboratoriais, não reagente na sorologia, negativo na citologia, histologia, PCR e cultura
Exposto	Assintomático, com/sem alterações laboratoriais leves, reagente na sorologia (níveis de anticorpos baixos a médios), negativo na citologia, histologia, PCR e cultura
Infectado sadio	Assintomático, com/sem alterações laboratoriais leves, níveis de anticorpos de baixos a médios, positivo na citologia, histologia/imuno-histoquímica, PCR e/ou cultura.
Infectado doente	Sintomático com/sem alterações laboratoriais, reagente na sorologia (níveis de anticorpos baixos a altos),

	positivo na citologia, histologia, PCR e/ou cultura
--	---

Nas alterações dermatológicas, a principal é a dermatite esfoliativa com descamação, muito comum na cabeça, orelhas e extremidades. Pode haver hiperqueratose nasodigital com hipotricose ou alopecia na região, além de alopecia periocular. Outros achados também incluem a onicogribose, dermatite ulcerativa, despigmentação nasal com erosões e ulcerações, dermatite nodular e piodermite bacteriana secundária (MAIA, 2013; ALVES et al., 2015).

Nas alterações sistêmicas, suas manifestações clínicas variam de acordo com a resposta imunológica expressa pelo animal infectado. Hepatomegalia e esplenomegalia são achados corriqueiros podendo ser detectados antes mesmo de um exame ultrassonográfico, pois os mesmos, quando em tamanho exacerbado, podem ser apalpados durante exame físico (ROCHA et al., 2022).

Outras alterações encontradas são a conjuntivite, inflamação das margens das pálpebras, rinite, poliartrite neutrofílica e glomerulonefrite, sendo esta última induzida por imunocomplexos podendo resultar nos sinais clássicos de poliúria, polidipsia, proteinúria e em casos graves, a síndrome urêmica (ROCHA et al., 2022). Como consequência dessas alterações podemos encontrar secreção ocular, tosse, epistaxe, poliúria, polidipsia, icterícia, letargia, intolerância a exercícios, febre, perda de peso, êmese e diarreia. Na fase final da doença, geralmente ocorre paralisia dos membros posteriores, caquexia, inanição levando ao óbito, sintomas estes que podem ser confundidos com outras doenças de caráter infeccioso, imunomediado ou neurológico, como a cinomose (BRASIL, 2014; FREIRE e MORAES, 2019).

Existem métodos de diagnóstico diretos e indiretos para LVC e a escolha da técnica a ser usada depende da fase da patogenia (estadiamento) e dos sinais clínicos apresentados pelo animal.

2.4. Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose deve ser fundamentado na análise conjunta de três fatores: clínica, epidemiologia e exames laboratoriais. Este conjunto é

indispensável para ter um diagnóstico mais assertivo, visto que os sinais clínicos da LVC por vezes são inespecíficos ou se assemelham com as de outras hemoparasitoses como a erliquiose, babesiose e tripanossomíase, principalmente nas áreas endêmicas à coexistência dessas enfermidades. Dentre os métodos diagnósticos mais utilizados se destacam os sorológicos, parasitológicos e moleculares (BRASIL, 2006).

As técnicas sorológicas recomendadas atualmente pelo Ministério da Saúde para inquérito canino são o teste rápido imunocromatográfico *Dual Path Platform* (TR DPP® Leishmaniose) e o ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA). Porém a desvantagem destes testes seria a incapacidade de detectar cães infectados antes da soroconversão e a possibilidade de ocorrer reação cruzada com anticorpos produzidos em resposta a outros agentes infecciosos como *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp. e *Trypanosoma* sp., o que pode acarretar em resultados falso-positivos assim como abordagens terapêuticas equivocadas (SILVA et al., 2011).

A falta de um método de diagnóstico mais eficiente e rápido dificulta a aplicação correta e antecipada do tratamento, prejudicando o controle da LVC e reduzindo as perspectivas de sucesso terapêutico. Por essa razão, urge a investigação e o aprimoramento de técnicas diagnósticas não invasivas, ágeis, economicamente acessíveis e altamente sensíveis para a LVC principalmente em regiões onde a doença é endêmica.

Para avaliar a efetividade dos métodos diagnósticos, são considerados principalmente dois fatores: sensibilidade e especificidade. A sensibilidade refere-se à proporção de resultados positivos em indivíduos doentes, enquanto a especificidade indica a proporção de resultados negativos em indivíduos saudáveis, e considerando-se a prática clínica e epidemiológica, deseja-se que esses valores sejam elevados num método diagnóstico. No contexto da leishmaniose, é importante destacar que a utilização de diferentes técnicas diagnósticas em conjunto amplia a eficiência desses dois critérios mencionados anteriormente (VARGAS; MARIA, 2023).

2.4.1 Diagnóstico parasitológico

O método parasitológico é considerado o padrão-ouro, além de ser o mais utilizado na rotina clínica dos médicos veterinários para LVC. Consiste na detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em material de aspirados de medula óssea, linfonodos ou raspado de pele, ou outros tecidos em locais que ocorrem a multiplicação do parasito (NISHIDA E DELMASCHIO, 2017; ALMEIDA, 2016).

O procedimento consiste na fixação da amostra em lâmina e coradas pelos métodos Giemsa, Leishman ou Panótico Rápido, que possibilitam a visualização do parasito em microscopia. Na mesma, as formas visualizadas são amastigotas, apresentando-se em forma oval, esférica, com núcleo grande e arredondado, localizadas normalmente no interior de macrófagos e outras células com característica mononuclear fagocitária, tornando este um método altamente específico (MAIA, 2013; COSTA, 2020).

Quando observada a presença do parasito na microscopia, há o diagnóstico conclusivo da infecção, garantindo segurança no diagnóstico. Por mais que esses exames sejam considerados assertivos, simples e práticos, têm uma sensibilidade variável (53-86%), pois depende da qualidade da amostra, capacidade técnica do técnico e da qualidade dos corantes utilizados. Além de que dependendo do número de parasitos na amostra e da quantidade de campos observados na microscopia, pode gerar resultados falsos-negativos, principalmente em cães assintomáticos (NISHIDA E DELMASCHIO, 2017; ALMEIDA, 2016; BRAZ et al., 2015).

2.4.2 Diagnóstico imunológico

Os testes imunológicos são utilizados devido à grande quantidade de anticorpos, produzida pelos animais infectados, principalmente a imunoglobulina G (IgG). Esses anticorpos podem ser detectados por variadas metodologias imunológicas, tornando uma ferramenta atrativa o diagnóstico sorológico, principalmente pela relativa facilidade na execução da técnica, custo reduzido e ainda pode ser aplicado em uma grande população. Porém, mesmo sendo amplamente utilizados estes testes não apresentam 100% de sensibilidade e

especificidade, além de que os resultados podem ter sua acurácia comprometida por diversos fatores (JERICÓ et al., 2015).

A sensibilidade sorológica pode estar comprometida em animais recém infectados ou no período pré-patente podendo apresentar resultado falso negativo pela insuficiente produção de anticorpos detectáveis, se tornando uma problemática, principalmente em regiões endêmicas. Além disso, o grau de resposta imunológica sofre variação de indivíduo conforme sua condição clínica. (GREENE E VANDEVELDE, 2015; JERICÓ et al., 2015).

A especificidade dos testes sorológicos também pode ser comprometida, principalmente frente a reações cruzadas com anticorpos produzidos por outros agentes infecciosos, principalmente hemoparasitos como os já citados *Ehrlichia* sp., *Babesia* sp. e *Trypanosoma* sp.. A presença desses e outros agentes podem acarretar em resultado falso positivo, assim como cães filhotes com idade inferior a 5 meses podem ser reagentes ao teste devido aos anticorpos colostrais de origem materna (SILVA et al., 2011; LARSON, 2016).

Dentre os métodos sorológicos mais utilizados estão o teste de ELISA e reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Além destes, outro teste corriqueiro na rotina clínica veterinária é o teste imunocromatográfico, que possui como vantagem a rapidez e fácil leitura, mas que em contrapartida apresenta uma sensibilidade reduzida, aumentando os riscos de resultados falsos (SOUSA et al., 2014; GREENE E VANDEVELDE, 2015; SOUZA et al., 2019).

2.4.2.1 Teste imunocromatográfico rápido

O teste rápido imunocromatográfico é muito utilizado como um método de triagem dispensando laboratório e equipamentos especializados, sendo uma ferramenta prática e acessível, principalmente em campanhas de saúde pública, abrigos e clínicas com infraestrutura laboratorial limitada. O principal teste utilizado é o DPP® (*Dual Path Platform* Leishmaniose Bio Manguinhos). A sensibilidade varia de 72-97% e sua especificidade de 61-100% (SOUSA et al., 2014; NISHIDA E DELMASCHIO, 2017; SOUZA et al., 2019).

O teste baseia-se na técnica de imunocromatografia de fluxo lateral, podendo ser realizado com sangue total, soro ou plasma. Sua metodologia consiste

na detecção de anticorpos, utilizando o método antígeno-anticorpo. O teste tem imobilizado em membrana os antígenos recombinantes, sendo o rk28 específico para *Leishmania* spp., no qual quando o soro do animal é aplicado, anticorpos específicos se ligam aos antígenos e formam um complexo, sendo este visualizado por meio de um marcador corado (imunocromafins), como o ouro coloidal. Caso o resultado seja positivo, realiza-se exames confirmatórios e se negativo, o animal é considerado negativo (SOUZA et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2018).

No entanto, esses testes não possibilitam realizar a quantificação de anticorpos, limitando sua utilidade como método de monitoramento ou acompanhamento. Outra limitação presente é a incapacidade de diferenciar animais infectados dos vacinados contra leishmaniose, sendo necessário verificar essa possibilidade antes de realizar o teste diagnóstico, evitando assim resultados falso positivo (FIGUEIREDO et al., 2018).

2.4.2.2 Ensaio Imunoenzimático - ELISA

Considerado mais padronizável e com uma boa relação custo-benefício, o ensaio imunoenzimático ELISA (do inglês “*Enzyme Linked Immunonorbent Assay*”), é uma das metodologias mais amplamente utilizadas em laboratórios de diagnóstico veterinário e humano. É uma técnica cuja busca por antígenos ou anticorpos se dá pela indução do processo de reação antígeno-anticorpo, junto à adição de uma enzima, comumente a peroxidase, para que ocorra reação ao anticorpo (caso esteja presente) e propiciar a visualização a partir de uma reação cromogênica que resulta numa coloração, cuja intensidade é medida por espectrofotometria, sendo proporcional à quantidade de anticorpo presente na amostra (TRAVI et al., 2018).

Tendo em vista que é um teste que depende da quantidade de anticorpo presente, o desempenho do mesmo está relacionado a fatores biológicos e técnicos, como o estado clínico do animal, sendo este um fator crucial na acurácia do mesmo. Ou fator que interfere é a hemólise, seja por uma coleta traumática, pela transferência do sangue coletado ao tubo, ou mesmo um transporte mal acondicionado, pois haverá ruptura de hemácias e liberação de hemoglobina, que podem interferir na leitura da absorbância pela coloração avermelhada da amostra

ou acoplamento da molécula de hemoglobina no lugar do anticorpo, gerando resultados falsamente positivos (FARIA E ANDRADE, 2012; LIPPI et al., 2012). Este teste apresenta uma especificidade que varia de 81-100% e sensibilidade entre 80-95%, independentemente do tipo de antígeno empregado no teste (LAURENTI, 2009).

2.4.2.3 Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é outro teste sorológico muito aplicado para detecção de anticorpos contra *L. infantum*, muitas vezes combinado com o ELISA para um melhor resultado. Mesmo tendo sido considerado um exame referência por muitos anos no diagnóstico da LVC, possui muitas limitações, como a subjetividade na leitura, pois a mesma é baseada na interpretação visual em microscópio de fluorescência, exigindo uma maior demanda por profissional com capacitação técnica, qualidade na preparação da técnica e condições adequadas do microscópio de fluorescência. É realizado através da diluição do soro do animal em solução salina, buscando a visualização de promastigotas por fluorescência na lâmina (AOKI et al., 2010; EVARISTO et al., 2021).

As amostras dos animais suspeitos serão diluídas em solução salina tamponada e posteriormente adicionadas as lâminas onde estará fixado forma promastigotas de *Leishmania* spp., ocorrendo a reação de anticorpos contra o parasito (caso esteja presente). A visualização da reação ocorre por meio da identificação de fluorescência com o auxílio de microscópio específico. Caso haja ligação destes anticorpos, o animal possui IgG contra o antígeno em questão, caso o conjugado utilizado seja anti-IgG. A diluição de referência, preconizada pelo Ministério da Saúde, para classificar um animal como reagente ou não reagente é de 1:40 (Referência manual do Ministério da saúde). Em casos de leishmaniose visceral, normalmente encontram-se títulos elevados devido à alta carga parasitária (LUCIANO et al., 2009). O teste de imunofluorescência indireta possui 80-100% de especificidade, e de 90-100% de sensibilidade (LAURENTI, 2009).

2.4.3 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica é uma técnica de diagnóstico direto, que faz a avaliação de métodos histológicos convencionais à detecção de antígenos em tecidos por meio de anticorpos. Esse método tem apresentado uma elevada especificidade e bom desempenho frente a casos cuja confirmação diagnóstica se mostra difícil ou inconclusiva. Ele é realizado a partir da identificação do parasito em cortes de fragmentos de tecidos retirados por biopsias, principalmente da face interna do pavilhão auricular de cães, no qual são encontradas maiores concentrações do parasito, ou conteúdo obtido através da punção de linfonodos ou medula óssea (LIMA et al., 2013; GUERRA et al., 2016; COSTA, 2020).

O exame consiste na associação do antígeno de *Leishmania* spp. com um anticorpo (Ac primário). Logo após, um segundo anticorpo irá se ligar ao primeiro (Ac secundário), permitindo assim, a visualização do antígeno (LIMA et al., 2013; GUERRA et al., 2016).

O emprego deste método diagnóstico propicia melhores resultados pois tem um melhor contraste e visualização, aumentando sua sensibilidade e especificidade na detecção do agente. Ele a especificidade da reação antígeno-anticorpo com a preservação da morfologia tecidual, o que permite além da visualização do parasito em si, também a análise do processo inflamatório e infeccioso no tecido avaliado, permitindo realizar caracterização histopatologia da resposta do animal. Além disso, possui como vantagem significativa a possibilidade de detectar parasitas mesmo com amostras de baixa carga parasitária. Em contrapartida, como limitação a demora na execução da técnica. Possui 70 a 80% de sensibilidade e 100% de especificidade resultando em um valor maior quando comparado com a histopatologia (LIMA et al., 2013; GUERRA et al., 2016; MUNFORD, 2016, COSTA, 2020).

2.4.4 Diagnóstico molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”) trata-se de uma técnica que tem a capacidade de amplificar sequências de DNA específicas, e sua utilidade para diagnóstico de *Leishmania* spp. se dá pela busca do DNA do parasita no tecido do animal (MESQUITA et al., 2001). É um

método muito utilizado para o diagnóstico de LVC pois é altamente sensível e específico (LIMA et al., 2013; NISHIDA e DELMASCHIO, 2017; BARRIOS e ALICIA, 2018).

2.4.4.1 PCR convencional

A PCR convencional consiste na amplificação do DNA do protozoário que pode ser extraído de diversos tecidos do animal, utilizando o par de oligonucleotídeos para *Leishmania* spp., geralmente encontrado em regiões do DNA cinetoplastídico ou ribossômico. Pode ser realizada através de amostras biológicas obtidas por biopsia ou aspirado de linfonodo, medula óssea, baço e outros órgãos em que ocorra proliferação do protozoário. Também podem ser utilizadas amostras de sangue, mas não é recomendável devido à baixa sensibilidade (NISHIDA E DELMASCHIO, 2017; LIMA et al., 2013; BARRIOS E ALICIA, 2018).

O processo consiste em três etapas principais: desnaturação, anelamento e extensão. Na primeira etapa, ocorre a desnaturação da fita de DNA molde, seguido da adição dos segmentos de ácidos nucleicos (primers). Em seguida, ocorre o anelamento de *primers* específicos, e por fim, a polimerase irá adicionar as bases nitrogenadas complementares a fita molde para posterior análise dessa fita de DNA, a fim de buscar um genoma páreo ao do protozoário de leishmaniose (QUEIROZ et al., 2010).

A PCR é uma técnica qualitativa, ou seja, permite detectar apenas a presença ou ausência do DNA do parasito, não havendo sua quantificação. Isso, aliado ao fato de requerer a necessidade de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, para visualização do produto amplificado, tornam este exame desvantajoso, representando limitação em questão ao monitoramento da evolução clínica, assim como acompanhamento da eficácia da terapêutica implicada (QUEIROZ et al., 2010; LIMA et al., 2013; NISHIDA e DELMASCHIO, 2017; BARRIOS e ALICIA, 2018).

2.4.4.2 PCR em tempo real - qPCR

Também conhecida como qPCR (do inglês “*quantitative Polymerase Chain Reaction*”), a PCR em tempo real é uma técnica quantitativa, se apresentando como uma evolução da PCR convencional, proporcionando monitoramento em tempo real da amplificação do DNA e fornecimento de dados a respeito da carga parasitária do mesmo nas amostras avaliadas (MAIA et al., 2008; REITHINGER & DUJARDIN, 2007).

Possui capacidade de monitorar e quantificar a amplificação do produto, sendo através da utilização da enzima DNA polimerase termoestável em conjunto com fluoróforo para a detecção em tempo real do DNA formado, utilizando corantes ou sondas fluorescentes. Um corante muito utilizado é o SYBR Green (Applied Biosystems, CA, USA), onde irá se ligar de forma não específica nas sequências de DNA de fita dupla, geradas durante a amplificação (REITHINGER e DUJARDIN, 2007). Já o sistema TaqMan (Applied Biosystems, CA, USA), consiste em uma sonda que se liga especificamente à sequência alvo, e que, durante a amplificação do produto, emite uma fluorescência específica. O uso desta sonda aumenta a especificidade da técnica (REITHINGER e DUJARDIN, 2007).

A principal vantagem desse método está no monitoramento contínuo da amplificação do DNA do parasito, permitindo a quantificação parasitária em diferentes amostras, apresentando resultados que refletem a carga parasitária do animal, sendo útil para avaliação de gravidade da infecção, eficácia da terapêutica, detecção de recidivas ou reinfecções e diferenciação de portadores assintomáticos com baixa carga daqueles com infecção ativa e mais intensa (MAIA et al., 2008).

Esta reação é utilizada em um termociclador específico para qPCR que repete as três fases da PCR (desnaturação, anelamento e extensão).

2.5 Espectroscopia UV-vis

Como descrito acima, os métodos usuais de diagnóstico não possuem alta sensibilidade ou especificidade, além de ocorrer uma possível reação cruzada. Também podem ter alto custo, serem demorados, dificultando a confirmação da doença e levar a disseminação desta.

Tendências de pesquisas para o diagnóstico, buscam inovações que facilitem a obtenção de resultados precisos utilizando metodologias não invasivas, além de proporcionar um diagnóstico em tempo inferior aos métodos tradicionais (PEPE et al., 2001; ETZIONI et al., 2003; GARNETT et al., 2012;). Sendo assim, o emprego de técnicas de espectroscopia óptica vem se destacando pelo potencial demonstrado no diagnóstico preciso e altamente seletivo de diversas doenças.

As principais amostras que tem sido utilizadas são de biofluidos como urina, plasma e soro sanguíneos (ALUM et al., 2008; PSYCHOGIOS et al., 2011; GARNETT, 2012). A urina é muito utilizada devido à alta concentração de compostos, sendo possível a identificação de xenobióticos provenientes de medicamentos e contaminações. Já o soro e o plasma fornecem informações sobre as perturbações do controle homeostático, como alterações nas proteínas, lipídios e peptídeos (ALUM et al., 2008). Estes biofluidos possuem características importantes para servirem como meio diagnóstico de fácil acesso para identificação dos biomarcadores de doenças (BELLISOLA; SORIO, 2012), partindo-se do princípio de que a doença distribuirá “informações” por todo o organismo (PSYCHOGIOS et al., 2011).

Assim, o emprego desta técnica no estudo de biofluidos para diagnóstico de doenças pode permitir a detecção de analitos importantes para um diagnóstico clínico em tempo real (KUMAR et al., 2013), por se tratar de um método não invasivo, de fácil aplicabilidade e alta reprodutividade, e também atingindo índices consideráveis de precisão, especificidade, sensibilidade de baixa taxa de erros falsos positivos e verdadeiros negativos (BELLISOLA; SORIO, 2012; DUNN; JEGALIAN; GREENWALD, 2010).

Em estudos recentes, usando soro sanguíneo canino, cães infectados com *Leishmania infantum* foram identificados com 85% de precisão utilizando espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) (LARIOS et al., 2021) e 75% de precisão usando espectroscopia UV-vis (COELHO et al., 2023). Além das diferentes análises de dados, a diferença no resultado final da pode estar relacionada a cada técnica; o FTIR fornece informações relacionadas aos modos vibracionais moleculares, enquanto o UV-vis por sua vez, fornece informações relacionadas à transição eletrônica em orbitais moleculares.

O FTIR pode acessar informações mais importantes do ponto de vista molecular. No entanto, a espectroscopia UV-Vis é mais comum em laboratórios, fácil de manusear, econômica e tecnicamente mais viável. Neste estudo, utilizamos soro sanguíneo canino na espectroscopia UV-Vis e algoritmos de aprendizado de máquina para construir um modelo de predição para o diagnóstico de *L. infantum*. Aqui, a inclusão de *Ehrlichia canis* também foi utilizada a fim de avaliar o cenário onde co-infecções pudessem coexistir.

3. OBJETIVO

Avaliar a capacidade da espectroscopia UV-Vis, associada ao aprendizado de máquina na identificação específica de animais infectados por *Leishmania infantum*.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar espectroscopia UV-Vis, associada ao aprendizado de máquina na identificação das amostras positivas e negativas para *L. infantum* em soros de cães;
- Avaliar espectroscopia UV-Vis, associada ao aprendizado de máquina na identificação das amostras positivas e negativas para *Ehrlichia canis* em soros de cães;
- Avaliar a capacidade do método em diferenciar infecções por *Leishmania* de infecções por *Ehrlichia* em amostras de soro de cães.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção das Amostras

As amostras de soro de cães utilizadas no presente estudo foram oriundas do banco de amostras do Laboratório de Biologia Molecular FAMEZ/UFMS, Laboratório de Biologia Molecular (LABMOL) e Laboratório Vet Analisa. Todos situados no município de Campo Grande (20° 28' 53" S, 54° 36' 58" O), Mato Grosso do Sul.

Um total de 120 amostras de soro sanguíneo foram utilizadas. As amostras foram separadas em grupos com base nos resultados do teste sorológico imunocromatográfico rápido para *Leishmania* (TR-DPP, Fiocruz-Bio Manguinhos,

Brasil), conforme instruções do fabricante, e no teste de ELISA para *E. canis* (kit Imunotest *Ehrlichia canis* da Imunodot®) ou Dot Elisa para *E. canis* (Fabricante Biogal).

Após a análise desses resultados, as amostras foram alocadas em seus respectivos grupos, sendo eles: LPEP = *Leishmania* positivo e *E. canis* positivo (n=30), LNEP = *Leishmania* negativo e *E. canis* positivo (n=30), LPEN = *Leishmania* positivo e *E. canis* negativo (n=30), e LNEN- *Leishmania* negativo e *E. canis* negativo (n=30). As amostras foram mantidas a -20°C até o momento do uso.

4.2 Coleta dos Espectros UV-Vis e Análise de Dados

Após descongelamento as amostras foram adicionadas a microplacas de 96 poços (50uL por poço), e no aparelho *Multiskan Sky* (*Thermofisher Scientific*), na faixa de comprimento de onda entre 200 e 300nm com intervalos de 1nm, foram capturados os espectros em triplicata.

Primeiro, cada espectro UV-Vis foi submetido a pré-processamento utilizando a Variável Normal Padrão (SNV). Este método remove a variação da linha de base e redimensiona as absorbâncias, impedindo que variações experimentais aleatórias interfiram no resultado (RINANN, 2009). Em seguida, os espectros UV-SNV, na faixa de 200 nm a 300 nm, foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) (JOLLIFFE, 2016). A PCA é um método não supervisionado que converte múltiplas variáveis em poucos componentes principais por meio da redução de dimensionalidade, preservando a maior parte das informações das variáveis originais e expressando a variação dos dados em um gráfico de pontuação (*score plot*). Também possibilita analisar a principal variância dos dados na faixa espectral avaliada por meio do gráfico de carregamento (*loading plot*). A PCA constitui uma etapa importante para visualizar a tendência de classificação dos grupos. Os dados obtidos pela PCA demonstraram desempenho superior para a construção de modelos preditivos baseados em algoritmos de aprendizado de máquina, quando comparados aos dados espectrais brutos (LARIOS, 2021; LARIOS, 2020). Os scores obtidos foram utilizados para verificar a existência de agrupamentos e a remoção de outliers utilizando o critério de T2 de Hotelling (BEHDAD; MASSUDI; PAKDEL, 2024). Em seguida, (no mesmo conjunto de

dados) os dados tratados foram divididos aleatoriamente em 70% para treino e 30% para teste.

Finalmente, um teste de classificação de amostra foi realizado usando dados de PCA submetidos a algoritmos de aprendizado de máquina (ML). Foi utilizado algoritmos do tipo *Support Vector Machine* (SVM – Máquina de Vetores de Suporte), fazendo-se uso destas três funções:

- SVM *Linear* – função de kernel linear;
- SVM *Quadratic* – função de kernel polinomial de grau 2;
- SVM *Cubic* – função de kernel polinomial de grau 3.

O uso ou remoção de um determinado PC foi feito com base na precisão obtida usando a Análise Discriminante Linear (LDA) para classificar as amostras em um teste de Validação Cruzada Leave One Out (LOOCV). No LOOCV (validação cruzada “*leave-one-out*”), uma amostra é retirada do conjunto de dados, e as demais são utilizadas para construir o modelo de predição (treinamento). Em seguida, a amostra retirada é empregada para avaliar a qualidade do modelo (teste). Esse procedimento é repetido até que todas as amostras tenham sido testadas. A qualidade do modelo é medida pela acurácia, sendo calculada pela média do percentual de respostas corretas obtidas em cada iteração (WONG, 2015).

O modelo foi regularizado pelo uso de diferentes hiperparâmetros, como kernels linear e polinomial (degree 2 e 3) e valor C de 1, 10 e 100. Neste trabalho, dividimos as amostras em treino e teste na proporção de 60% e 40% aproximadamente. Os hiperparâmetros ótimos são definidos pela maior acurácia com melhor generalização, ou seja, menor diferença entre as acurácias de LOOCV e da Validação Externa. A partir das predições foram construídas as matrizes de confusão e foram obtidos os valores de sensibilidade, especificidade e f1-score. As análises utilizaram a biblioteca *Scikit-Learn* (versão 1.3.0) em Python (versão 3.11.5).

5. RESULTADOS

No presente estudo, as análises espectrais pré-processadas com o método SNV (*Standard Normal Variate*) demonstraram que os grupos avaliados

apresentaram um desvio padrão reduzido, como evidenciado na figura 1. Esse resultado indica que os dados obtidos se encontram próximos da média, sugerindo uma elevada precisão nas medidas espectroscópicas, com boa reprodutibilidade e baixa variabilidade intragrupo.

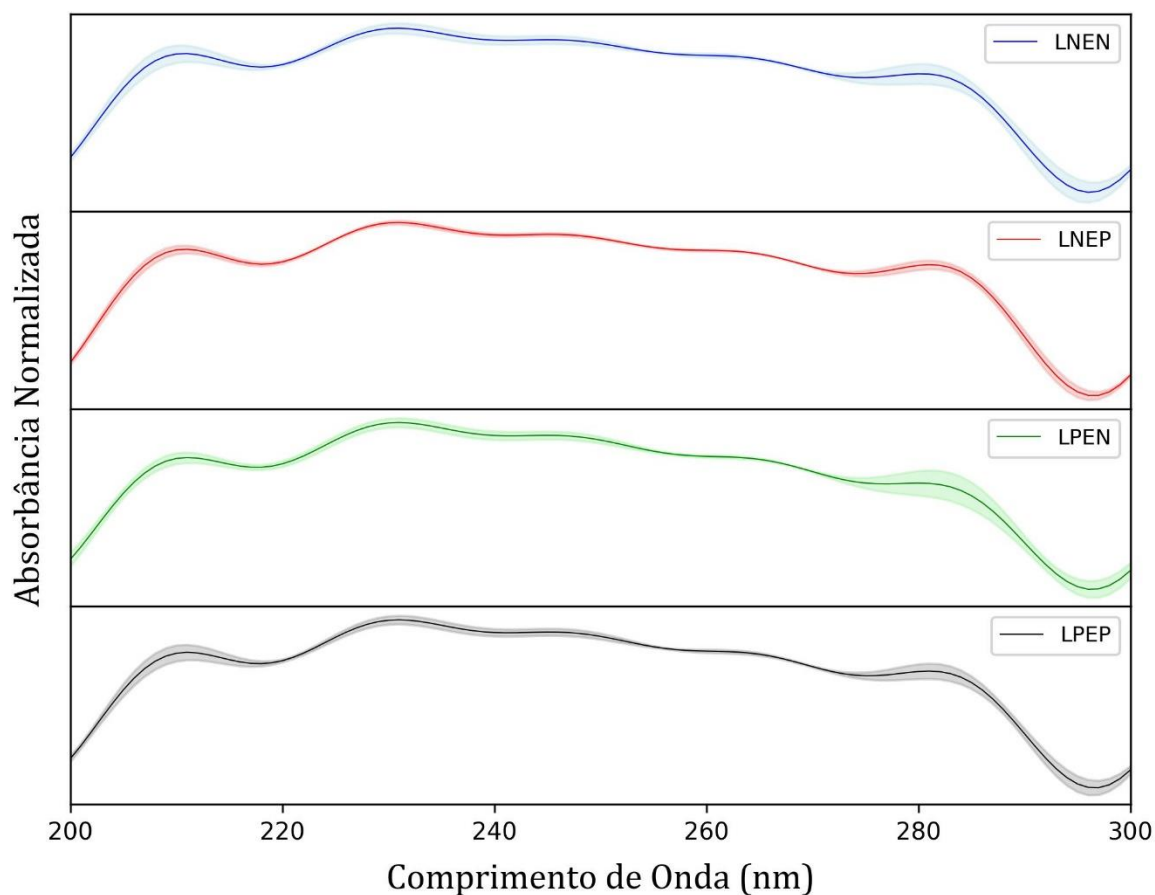


Figura 1: Espectros médios de soro canino obtidos por espectroscopia UV-Vis com pré-processamento SNV, para os grupos positivos e negativos para *Leishmania* e *Ehrlichia*. A sombra colorida ao redor de cada linha representa o desvio padrão, indicando a dispersão dentro de cada grupo. LPEN: *Leishmania* +/*Ehrlichia* -, LNEN: *Leishmania* -/*Ehrlichia* -, LPEP: *Leishmania* +/*Ehrlichia* + e LNEP: *Leishmania* -/*Ehrlichia* +.

A análise exploratória dos espectros UV-Vis de soro canino, após o pré-processamento SNV, por meio da Análise de Componentes Principais (PCA), demonstrou que os dois primeiros componentes principais explicaram aproximadamente 96% da variância total dos dados — com PC1 representando 70,7% e PC2, 25,3%. Esse resultado indica que maior variância dos dados, demonstrando a eficácia do pré-processamento aplicado.

Os escores plotados em PC1 e PC2 (Figura 2) evidenciaram uma tendência de agrupamento das amostras conforme suas respectivas classificações sorológicas. No entanto, na visualização em duas dimensões observou-se considerável sobreposição entre os grupos, especialmente entre as amostras oriundas de animais coinfectados, sugerindo que há características espectrais semelhantes entre os soros de cães infectados por *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, ambos os agentes ou nenhum deles.

A análise dos *loadings* revelou que regiões espectrais utilizadas estão associadas à variância explicada por PC1 e PC2. Essas faixas espectrais são compatíveis com bandas de absorção características de biomoléculas como proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos, cujas concentrações podem variar conforme o estado infeccioso do animal. Assim, a PCA confirmou a presença de informações espectrais discriminativas entre os grupos analisados, constituindo uma etapa exploratória fundamental antes da aplicação de modelos supervisionados de classificação.

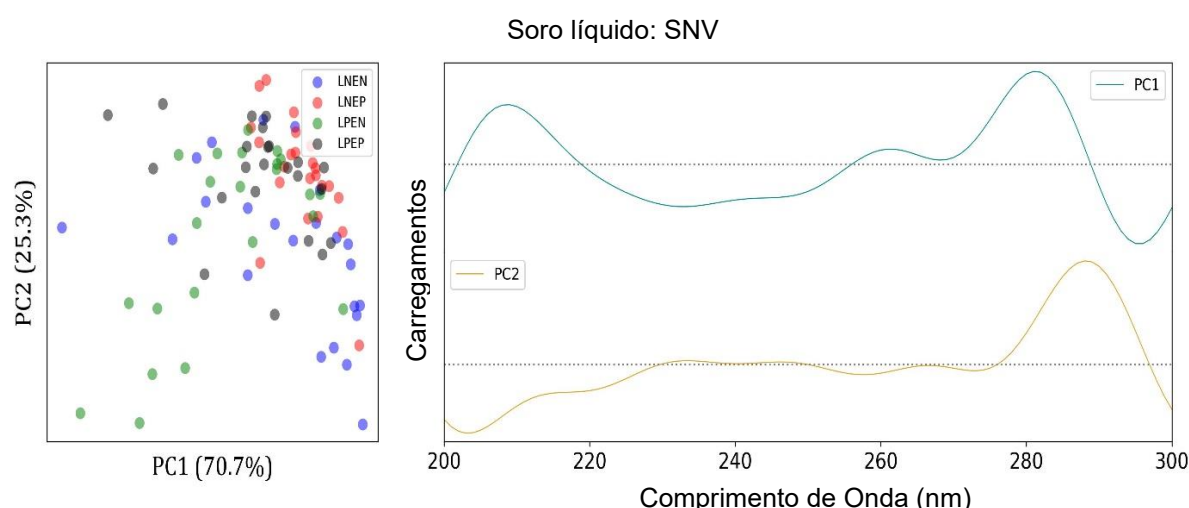


Figura 2. Análise de Componentes Principais (PCA) dos espectros de absorbância UV-Vis de soro canino, após pré-processamento SNV. À esquerda, gráfico de escores representando a distribuição das amostras nos dois primeiros componentes principais: PC1 (70,7%) e PC2 (25,3%). À direita, gráficos de carregamento (*loadings*) de PC1 e PC2 evidenciam as regiões espectrais mais relevantes para a variância observada.

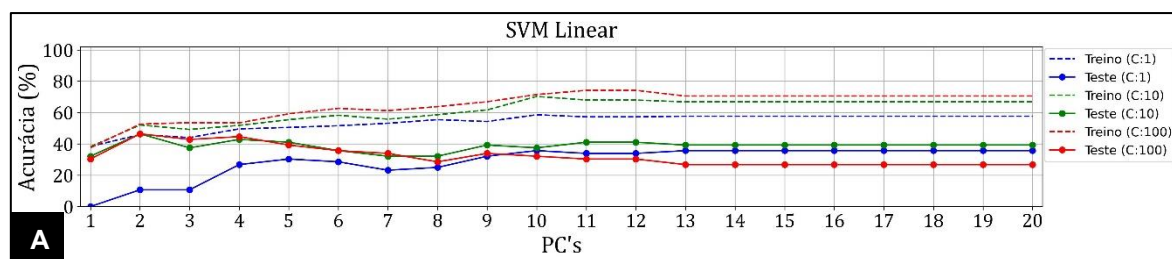
Foram testadas três funções diferentes (linear, quadrática e cúbica) do algoritmo SVM (Figura 3). Todas foram aplicadas ao soro canino pré-processados por SNV, com diferentes números de componentes principais (PCs) como entrada,

e diferentes valores de parâmetro de penalidade ($C=1, 10, 100$). O parâmetro C (penalidade) controla o quanto o modelo permite violar a margem de separação entre as classes. Um C pequeno (por exemplo o $C=1$) é um modelo mais simples, que permite mais erros de classificação, ou seja, uma maior margem. Um C grande (exemplo $C=100$), seria um modelo mais complexo, tenta separar melhor o treino, mas ocorre maior risco de *overfitting*. O melhor modelo não é aquele que atinge maior acurácia no treino, mas sim que mantém um equilíbrio entre uma boa performance no treino e teste. Quando temos uma menor distância entre treino e teste (menor diferença entre as curvas), nos indica que o modelo generaliza melhor.

Após a aplicação do SVM, foram avaliados diferentes núcleos (linear, quadrático e cúbico) e valores do parâmetro de penalidade ($C=1, 10, 100$). Embora o modelo cúbico com $C=100$ tenha apresentado uma melhor acurácia no conjunto de treino, nota-se uma diferença entre as curvas de treino e teste, indicando um provável *overfitting*. O modelo quadrático $C=1$, por outro lado, apresentou menor diferença entre treino e teste, refletindo uma melhor capacidade de generalização.

A matriz de confusão (Figura 4), foi gerada a partir do modelo quadrático $C=1$, considerando o critério de menor distância entre os desempenhos de treino e teste. No conjunto de treino, o modelo apresentou acurácia geral de 42,9%, com desempenho variável entre as classes. Observou-se maior percentual de acertos nas classes LNEP (78,6%) e LPEN (42,9%), enquanto LNEN e LPEP apresentaram percentuais de apenas 21,4% e 28,6%, respectivamente.

Já no conjunto de teste, o modelo alcançou acurácia geral de 47,2%, com desempenho ligeiramente melhor para a classe LNEP (88,9%), seguida por LNEN (55,6%). A classe LPEP teve 33,3% de acerto. Assim como no treino, houve confusões principalmente entre LNEN e LNEP, além de LPEP sendo frequentemente classificado como LNEP.



A

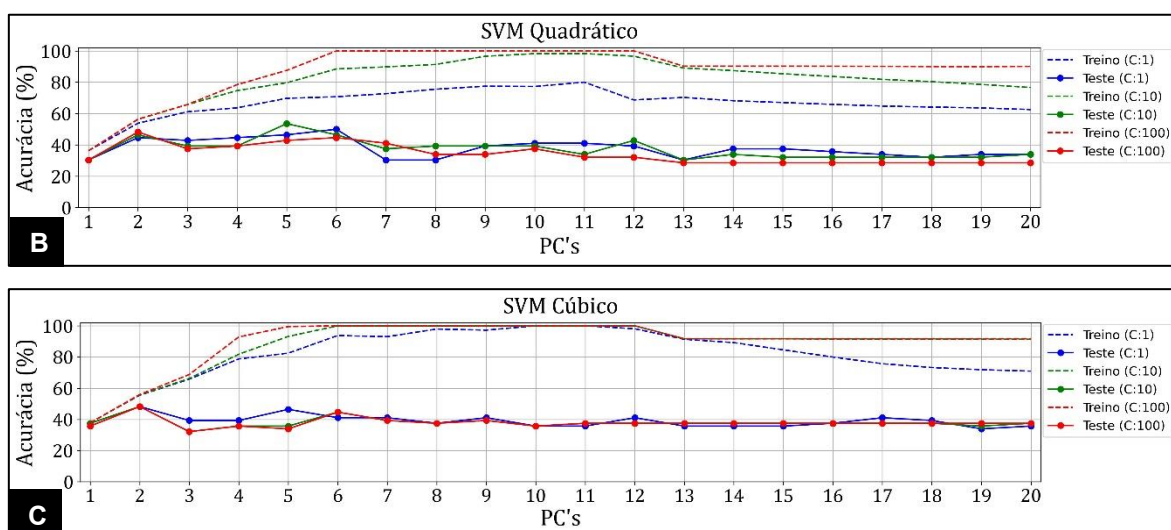


Figura 3. Acurácia (%) obtida pela aplicação do modelo de *Support Vector Machine* (SVM) com diferentes funções de kernel: Linear (a) Quadrática (b) e Cúbica (c) sobre os espectros de soro canino pré-processados por *Standard Normal Variate* (SNV). Foram testados três valores de parâmetro de regularização C (1, 10 e 100) para cada kernel. Os gráficos apresentam as curvas de acurácia para os conjuntos de treinamento e teste em cada combinação de kernel e parâmetro.

		Treino (42.9%) Quadrático (C1)				Teste (47.2%) Quadrático (C1)			
CLASSE VERDADEIRA	LNEN	21.4% 3	35.7% 5	14.3% 2	28.6% 4	55.6% 5	33.3% 3	0.0% 0	11.1% 1
	LNEP	0.0% 0	78.6% 11	0.0% 0	21.4% 3	11.1% 1	88.9% 8	0.0% 0	0.0% 0
	LPEN	7.1% 1	28.6% 4	42.9% 6	21.4% 3	0.0% 0	33.3% 3	11.1% 1	55.6% 5
	LPEP	7.1% 1	57.1% 8	7.1% 1	28.6% 4	11.1% 1	55.6% 5	0.0% 0	33.3% 3
		CLASSE PREVISTA				CLASSE PREVISTA			
		LNEN	LNEP	LPEN	LPEP	LNEN	LNEP	LPEN	LPEP

Figura 4. Matriz de confusão do modelo SVM Quadrático (C=1) aplicado ao conjunto com quatro classes (LNEN, LNEP, LPEN e LPEP). A primeira matriz refere-se ao conjunto de treino (acurácia de 42,9%) e a segunda ao conjunto de teste (acurácia de 47,2%). Os valores expressos correspondem a proporção (%) de amostras corretamente ou incorretamente classificadas em cada classe. Observa-se maior sensibilidade na classe LNEP, enquanto as classes LNEN, LPEN e LPEP apresentaram maior taxa de confusão, especialmente no conjunto de treino.

A partir destes resultados, optamos por dividir os grupos em dois cenários para realizar uma comparação: LNEN vs LPEN e LNEN vs LNEP, mantendo a mesma metodologia aplicada anteriormente.

Quando comparamos LNEN vs LPEN a PCA mostrou uma maior discriminação entre os dois grupos, com PC1 explicando 74,3% da variação. O modelo quadrático com 3 PCs resultou em uma acurácia de treino de 64,3% e teste de 61,1%. Na matriz de confusão (Figura 5) LNEN teve acerto de 85,7% no treino e 100% no teste, enquanto LPEN apresentou maior confusão, com acerto de 42,9% no treino e 22,2% no teste.

Já no cenário com LNEN vs LNEP a PCA também mostrou uma boa separação, com PC1 explicando 72,3%. O modelo quadrático ($C=1$) com 2 PCs apresentou acurácia mais alta: treino 82,1% e teste 77,8%. Na matriz de confusão (Figura 6) LNEN teve acerto de 78,6% no treino e 66,7% no teste; LNEP teve maior acurácia: 85,7% no treino e 88,9% no teste.

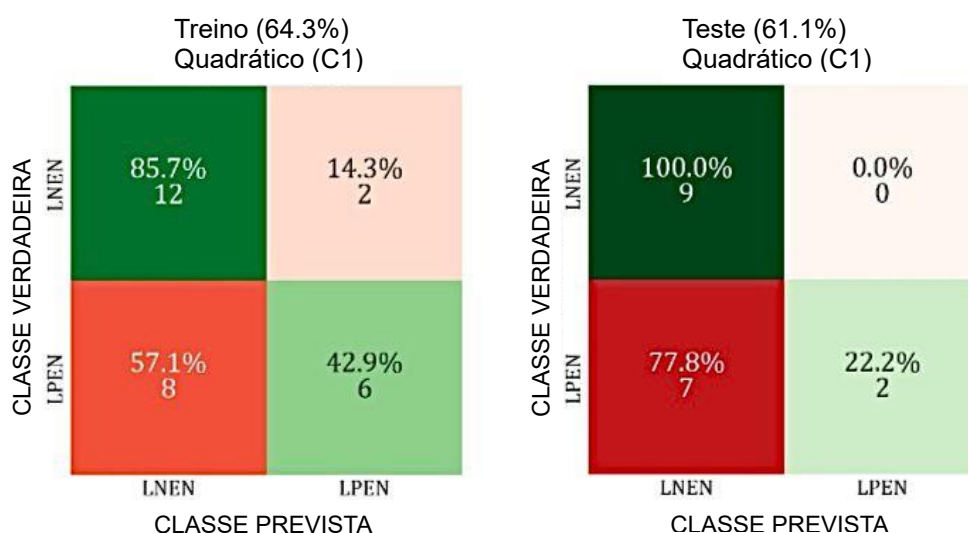


Figura 5. Matriz de confusão obtidas na etapa de treino (à esquerda) e teste (à direita) para classificação binária entre as classes (LNEN) e (LPEN), utilizando a Análise Discriminante Quadrática (QDA). No conjunto de treino, observou-se acurácia de 64,3% com sensibilidade de 85,7% para LNEN e 42,9% para LPEN. No conjunto de teste, a acurácia foi de 61,1%, sendo a sensibilidade de 100% para LNEN e 22,2% para LPEN.

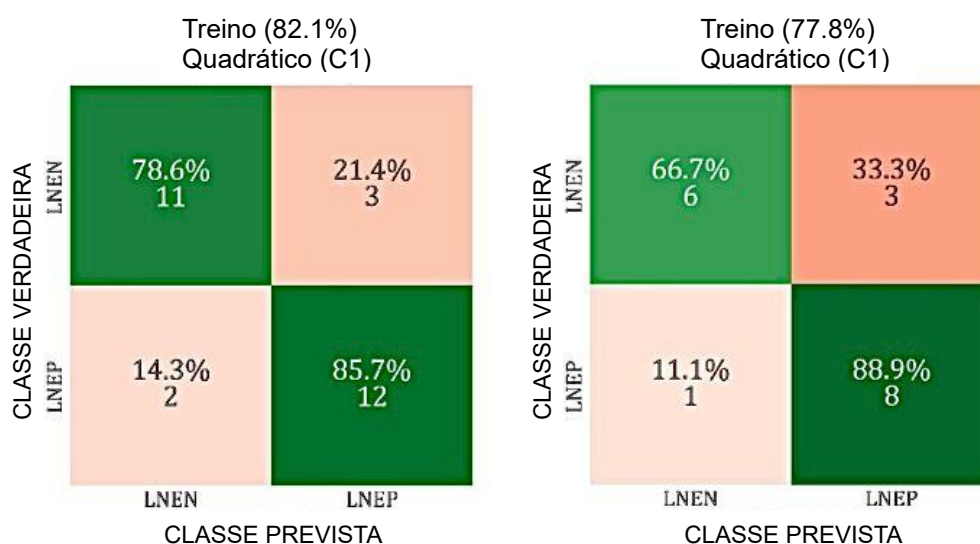


Figura 6. Matriz de confusão obtida na etapa de treino (à esquerda) e teste (à direita) para classificação binária entre as classes (LNEP) e (LNEP), utilizando Análise Discriminante Quadrática (QDA). No conjunto de treino, observou-se acurácia de 82,1%, com sensibilidade de 78,6% para LNEP e 85,7% para LNEP. No conjunto teste, a acurácia foi de 77,8%, sendo a sensibilidade de 66,7% para LNEP e 88,9% para LNEP.

6. DISCUSSÃO

A espectroscopia associada ao aprendizado de máquina tem mostrado potencial no diagnóstico de diferentes agentes infecciosos (Rezende et al., 2023; Pacher et al., 2024; França et al., 2025), inclusive *L. infantum* em cães (Larios et al., 2021; Coelho et al., 2023). No entanto, na maioria dos estudos prévios, comparações entre apenas dois grupos (positivo e negativo; infectado e não infectado) predominaram.

No presente estudo, com o objetivo de avançar mais no conhecimento e desenvolvimento do método, avaliou-se o efeito das co-infecções sobre a capacidade da metodologia em classificar corretamente as amostras positivas e negativas para *L. infantum*. Nesse contexto, embora o potencial da espectroscopia UV-Vis associada ao aprendizado de máquina para fins de diagnóstico tenha se confirmado, observou-se que co-infecções podem dificultar sobremaneira a capacidade dos algoritmos em distinguir as amostras positivas das negativas.

Os espectros brutos das amostras foram submetidos ao pré-processamento utilizando o método *Standard Normal Variate* (SNV), que permite com que os

espectros se tornem mais comparáveis entre si, proporcionando uma maior facilidade na detecção de padrões sistemáticos frente à presença de infecções. Essa etapa mostrou-se essencial para efeitos relacionados a dispersão de luz e variações instrumentais, permitindo assim uma normalização adequada dos dados (Rinnan et al., 2009).

A comparação entre os espectros brutos e os espectros após o SNV evidenciou uma melhor qualidade das curvas espectrais, destacando regiões de absorção relevantes no intervalo de 200 a 300 nm, em que há o predomínio de absorções de biomoléculas, como as proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos. Isso impacta diretamente na qualidade das análises estatísticas posteriores, como a PCA e os modelos de aprendizado de máquina, permitindo com que essas ferramentas capturem de forma mais precisa as variações causadas pela infecção estudada.

A análise exploratória por PCA permitiu visualizar a distribuição das amostras nos eixos principais de variância, com padrão semelhante ao observado por Coelho et al. (2023), que também relataram separações relevantes entre grupos de cães infectados com LVC e controles negativos a partir de UV-vis associada a PCA e SVM. A partir dos dados do SNV, o PCA revelou uma separação parcial entre os grupos, com maior destaque ao longo do componente principal (PC1), que explicou entre 64,9% da variância total. Embora não tenha havido uma boa distribuição entre todas as classes, foi possível observar tendências de agrupamento para a maioria dos grupos, enquanto o grupo LNEN (duplamente negativo) apresentou maior dispersão no espaço bidimensional, sugerindo uma maior variabilidade espectral. Esse agrupamento sugere que a técnica espectroscópica associada ao SNV possui capacidade discriminativa mesmo na presença de coinfeções, embora a sobreposição entre alguns grupos (especialmente os com positividade única) indique limitações da abordagem não supervisionada (LARIOS et al., 2021; COELHO et al., 2023).

Na etapa de classificação supervisionada, foram utilizados modelos de *Support Vector Machine* (SVM) com diferentes funções núcleo (Linear, quadrática e cúbica) e valores de penalização, conforme já indicado anteriormente. Embora o modelo cúbico com $C = 100$ tenha apresentado maior acurácia de treino (Figura 3),

o modelo quadrático com $C = 1$ apresentou menor distância entre os valores de treino e teste, indicando menor risco de *overfitting* e maior generalização. Vale ressaltar que modelos com valores altos de C (como $C = 100$) penalizam mais erros de classificação e tendem a se ajustar melhor ao conjunto de treino, no entanto podem perder capacidade de generalizar para novos dados.

Porém, a matriz de confusão revelou que embora o modelo *Quadratic Discriminant Analysis* (QDA) tenha conseguido discriminar adequadamente algumas classes, como a LNEP, o desempenho geral foi limitado, com acurácia de 42,9% na etapa treino, e 47,2% na etapa de teste. A elevada taxa de acertos na identificação de amostras com infecção isolada por *Ehrlichia canis* (LNEP) sugere que estas possuem um perfil espectral mais característico e distinto.

Em contrapartida, a confusão entre as classes LPEN e LPEP aponta para a existência de padrões espectrais similares entre amostras de cães infectados isoladamente por um dos agentes. Tal sobreposição pode ser explicada por mecanismos imunológicos comuns às infecções ou por alterações bioquímicas não específicas detectadas na faixa espectral analisada. A análise considerou, ainda, a presença de coinfecção por *Ehrlichia canis*, com o intuito de investigar a capacidade discriminativa da metodologia em cenários mais desafiadores, nos quais os agentes infecciosos possam coexistir.

A separação observada entre os grupos de cães infectados por *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis* mediante análise espectroscópica, especialmente após o pré-processamento SNV, sugere que as infecções induzem alterações bioquímicas específicas no soro dos animais. Esse achado indica que as infecções não apenas ativam respostas imunes distintas, mas também geram perfis metabólicos característicos que podem ser capturados por métodos espectroscópicos.

Na LVC, estudos relatam alterações em parâmetros bioquímicos séricos importantes. Dentre eles, destacam-se os aumentos da proteína C reativa (PCR), presente em cerca de 38% dos cães infectados, indicando resposta inflamatória sistêmica (BRAZ et al., 2018). Elevações de ureia e alterações em enzimas como a fosfatase alcalina e níveis de globulinas também são frequentes, refletindo tanto disfunção renal quanto hepática associadas à infecção (VIEIRA NETO et al., 2011).

Segundo Frazílio et al. (2018), cães com LVC em seu estudo, apresentaram elevação da gamma-glutamyltransferase urinária (UGGT) e da razão UGGT/creatinina sérica, indicando lesão tubular precoce. Já a cistatina C sérica e o índice de resistência arterial renal (RAR) apresentaram-se com alteração apenas nos estágios mais avançados da disfunção renal. Além disso, alterações em marcadores cardíacos, como CK-MB e troponina I (cTnI), foram associadas a lesões miocárdicas em cães com LVC (GODOY et al., 2013).

De modo semelhante, a infecção por *Ehrlichia canis* também promove alterações bioquímicas séricas e urinárias específicas. Biomarcadores como PCR, cistatina B urinária (uCysB) e clusterina urinária (uClust) são significativamente elevados em cães infectados, sugerindo processos inflamatórios e lesões renais subclínicas mesmo na ausência de sinais clínicos evidentes (VIEIRA, 2022). No estudo realizado por Zorzo (2023), as alterações bioquímicas mais frequentes apresentadas em cães infectados por *E. canis* foram aumento de CK, hiperglobulinemia, elevação de proteínas totais, aumento de ALP, elevação de ureia, redução da albumina, além de creatinina e ALT elevadas.

No cenário em que todas as quatro classes foram avaliadas juntas, observou-se uma acurácia baixa, cerca de 47,2%, com sensibilidade distribuída de forma desigual entre as classes. A matriz de confusão mostrou que a classe LNEP apresentou maior sensibilidade no teste (88,9%), enquanto as demais tiveram um desempenho inferior, refletindo maior dificuldade do modelo em separar corretamente os quatro grupos de forma simultânea.

Ao comparar os cenários binários, LNEN vs LPEN, a acurácia do treino foi de 64,3% com percentuais de acerto de LNEN 85,7% e LPEN 42,9%. No teste a acurácia foi de 61,1%, com acertos de 100% para o grupo LNEN e apenas 22,2% para LPEN. Esse resultado nos indica que o modelo acertou praticamente todas as amostras negativas para *Leishmania* mas teve grande dificuldade para identificar corretamente as amostras positivas, diferentemente do que ocorreu no estudo de Coelho et al. (2023), no qual observou-se percentual de acerto para amostras positiva entre 70% e 83,3%. É possível que tal discrepância entre os resultados tenha sido influenciada também pelos testes de referência utilizados para classificar as amostras como positivas. No estudo de Coelho foi utilizado uma combinação

entre ELISA e TR-DPP, aumentando a acurácia da classificação dos animais como positivos ou negativos. Já no presente estudo, foi utilizado apenas o teste TR-DPP.

No cenário LNEN vs LNEP, a acurácia do treino foi de 82,1%, com acertos de 78,6% para LNEN e 85,7% para LNEP. No teste a acurácia foi de 77,8%, 66,7% para LNEN e 88,9% para LNEP. Neste cenário, o modelo apresentou melhor equilíbrio entre as classes, conseguindo identificar corretamente a maioria das amostras positivas e negativas, com performance superior ao comparar apenas grupos positivos e negativos para *L. infantum*, sem coinfeção.

Na Tabela 1 é apresentado um resumo dos cenários avaliados no presente estudo, com destaque para as principais observações.

Tabela 1. Resumo dos cenários avaliados na classificação dos grupos sorológicos, considerando diferentes combinações de classes. São apresentados os valores de acurácia nos conjuntos de treino e teste, bem como observações relevantes relacionadas ao desempenho dos modelos e a separação entre os grupos, com base também nos resultados da PCA.

Cenário	Grupos	Acurácia (Treino/Teste)	Observações principais
Comparação múltipla	LNEN, LNEP, LPEN, LPEP	42,9% / 42,2%	Difícil separação entre as 4 classes; maior acurácia na classe LNEP; grande confusão entre LNEN, LPEN e LPEP.
Comparação binária 1	LNEN LPEN	64,3% / 61,1%	LNEN teve melhor performance, LPEN apresentou mais confusões;
Comparação binária 2	LNEN LNEP	82,1% / 77,8%	Melhor desempenho geral; LNEP teve maior porcentual de acerto;

Assim, os resultados obtidos neste trabalho, demonstram que o modelo tem maior capacidade de diferenciar grupos quando o problema é simplificado para apenas duas classes. Quando incluímos coinfeções e múltiplas classes, a performance apresenta redução relevante. A escolha do parâmetro de penalidade $C = 1$ foi importante, pois evitou *overfitting*. Modelos mais complexos (por exemplo o modelo cúbico com $C = 100$) até tiveram acurácia maior no treino, mas desempenho insatisfatório no teste (<50%).

Com base no que fora avaliado até o presente momento, a espectroscopia associada aos modelos de aprendizado de máquina testados apresenta grande potencial para determinar infecção ou não infecção em comparações dicotômicas, que por sua vez demandam uma suspeita clínica inicial. Mas, em um cenário exploratório, no qual não se possui uma suspeita inicial, e se deseja determinar quais infecções o paciente potencialmente possui, ainda serão necessários mais estudos para aprimoramento dos métodos de análise e composição dos bancos de dados de espectroscopia óptica.

7. CONCLUSÕES

Em síntese, os achados deste trabalho demonstram que a espectroscopia UV-Vis combinada com *machine learning* (SVM) é uma ferramenta promissora para o diagnóstico de *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis* em cães, desde que avaliados separadamente. E, as coinfeções exercem efeitos negativos substanciais na capacidade do método em segregar as amostras nos respectivos grupos.

8. REFERÊNCIAS

- ABBIATI, T.C.; FREITAS, D.M.; ALVES, L.C.; et al. Leishmaniose Visceral Canina: Relato de caso. **Pubvet**, v. 13, n. 4, p. 1-8, 2019. DOI: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n4a307.1-8>.
- ABRANTES, T.R.; WERNECK, G.L.; AMEIDA, A.S; et al. Fatores ambientais associados à ocorrência de leishmaniose visceral canina em uma área de recente introdução da doença no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00021117>.
- ALMEIDA, V. A. **Alterações na medula óssea e distúrbios hematológicos na Leishmaniose visceral canina**. 2016. 101f. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.
- ALVES, M. M. M.; MENDONÇA, I. L.; BATISTA, J. F.; et al. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. **Pubvet**, v. 9, n. 4, p. 158-162, 2015. DOI: <https://doi.org/10.22256/pubvet.v9n4.158-162>.
- AOKI, V.; SOUSA JÚNIOR., J. X.; FUKUMORI, L. M. I.; et al. **Imunofluorescência direta e indireta. Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 490–500. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0365-05962010000400010>.
- BARRIOS, G.; ALICIA, L. Leishmaniosis canina: herramientas moleculares utilizadas para el diagnóstico e investigación a partir de muestras biológicas. **Compend. Cienc. Vet**, v.8, n. 2, p. 36-43, 2018. DOI: [10.18004/compend.cienc.vet.2018.08.02.36-43](https://doi.org/10.18004/compend.cienc.vet.2018.08.02.36-43).
- BOWMAN, D. D. Protozoários. In: _____. **Georgis Parasitologia Veterinária**. 9. ed. New York: Elsevier, 2010, 1185 p., cap. 3.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1 ed., 5 reimpr., Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASILEISH. Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina. **Grupo de Estudo em Leishmaniose Animal – BRASILEISH**. 2018.

BRAZ, P. H.; LIMA, G. L.; SARTORETTO, M. C. et al. Alterações da proteína C reativa e fator reumatoide em cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1829-1833, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5297>.

BRAZ, P. H.; SARTORETTO, M. C.; SOUZA, A. S.; et al. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. **Acta Veterinária Brasília**, v. 9, n. 1, p. 87-90, 2015. DOI: <https://doi.org/10.21708/avb.2015.9.1.5273>.

CAMARGO, J.B.; TRONCARELLI, M.Z.; RIBEIRO, M.G.; et al. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 12, n.71, p.86-92, 2007. Disponível em: https://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/QKOIwIDa047cxSZ_2013-6-24-15-1-25.pdf.

COELHO, M. L.; FRANÇA, T.; MATEUS, N. L. F.; et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis by UV spectroscopy of blood serum and machine learning algorithms. Photodiagnosis and **Photodynamic Therapy**, v. 42, p. 103575, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103575>.

COSTA, G. P.; SILVA, D. P. C.; ROCHA, D. O. A. C.; et al. Métodos de diagnóstico da leishmaniose canina: revisão de literatura. **Revista Saber Científico**. v. 9, n. 2, p. 95-104. 2020. Disponível em: <https://periodicos.saolucas.edu.br/index.php/resc/article/view/1497/1193>.

CUAZITL, A. M.; ZAPIEN, G. J. V.; BRITO, M. S. et al. ATR-FTIR spectrum analysis of saliva samples from COVID-19 positive patients. **medRxiv** preprint, n. 11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.12.22.21268265>.

DICKERSON, B. D.; GEIST, B. L.; SPILLMAN JUNIOR, W. B.; et al. Canine cancer screening via ultraviolet absorbance and fluorescence spectroscopy of serum proteins. **Appl Opt**, v. 46, n. 33, p. 8080–8088, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1364/ao.46.008080>.

DE OLIVEIRA FRAZILIO F, DE ALMEIDA BORGES F, DE SOUZA AI, PALUMBO MIP, DO NASCIMENTO RAMOS CA, FREIRE DH, GALVÃO ALB, DE FREITAS MG, BARBOSA FB. Biomarcadores e índice de resistência arterial renal em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. **Parasitol Res**. 2018 novembro; 117(11):3399-3405. DOI: 10.1007/S00436-018-6032-2. Epub 2018 1º de agosto. PMID: 30069827.

ETZIONI, R.; PEPE, M.; LONGTON, G.; et al. Combining biomarkers to detect disease with application to prostate cancer. **Biostatistics**, v. 4, n. 3, p. 523–538, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/BIOSTATISTICS%2F4.4.523>.

EVARISTO, A. M. C. F.; SILVA, I. W. G.; OLIVEIRA, G. M. B.; et al. Detecção e caracterização molecular de *Leishmania* em cães do nordeste do Brasil. **Brazilian Journal of Global Health**. v. 4, n. 1. p. 23-29, 2021. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1134489/1/Deteccao-e-caracterizacao-molecular-2021.pdf>.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. de. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, 2012. DOI: <https://doi.org/10.5123/S2176-62232012000200007>.

FIGUEIREDO, F. B.; VASCONCELOS, T. C. B.; MADEIRA, M. F; et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 11, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760180260>

FREIRE, C. G. V.; MORAES, M. E. Cinomose canina: aspectos relacionados ao diagnóstico, tratamento e vacinação. **pubvet**. v.13, n.2, a263, p.1-8, 2019. DOI: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n2a263.1-8>.

GARNETT, M. J.; EDELMAN, E. J.; HEIDORN, S. J.; et al. Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. **Nature**, v. 483, n. 7391, p. 570–575, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11005>.

GODOY, K. C. S.; BRAZ, P. H.; ASSIS, A. R.; et al. Avaliação dos indicadores de lesão miocárdica em cães com leishmaniose visceral. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 313-320, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8236>.

GREENE, C. E., & VANDEVELDE, M. (2015). Cinomose. In: GREENE, C. E. (Ed.), **Doenças infecciosas em cães e gatos**. Guanabara Koogan. 2015. 1404 p., Cap. 3.

GUERRA, J. M.; FERNANDES, N. C. C. A; KIMURA, L. M.; et al. Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras de tecidos caninos. **Rev Inst Adolfo Lutz**. p. 75 -1686, 2016. DOI: <https://doi.org/10.53393/rial.2016.v75.33506>.

GUIDO, R.; FERRISI, S.; LOFARO, D.; et al. An Overview on the Advancements of Support Vector Machine Models in Healthcare Applications: A Review. **Information**. v. 15, n. 235. DOI: <https://doi.org/10.3390/info15040235>.

GUNASEKARAN, S.; NATARAJAN, R. K.; RENGANAYAKI, V.; et al. FTIR and UV Visible Spectrophotometric Approach to Discriminate Leukemic Sera. **Asian J. Chem**. v. 20, n. 4, p. 2521–2530, 2008. Disponível em: <https://asianpubs.org/index.php/ajchem/article/download/12647/12628>.

HANNA, K.; KRZOSKA, E.; SHAABAN, A. M.; et al. Raman spectroscopy: current applications in breast cancer diagnosis, challenges and future prospects, **Br. J. Cancer**. n. 126, p. 1125–1139, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41416-021-01659-5>.

IKEDA-GARCIA, F.A.; MARCONDES, M. **Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 12, n. 71, p.34-42, 2007.

JERICÓ, M. M., KOGIKA, M. M., & ANDRADE NETO, J. P. (2015). **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Guanabara Koogan.

KMETIUK, S. M.; TIRADO, T. C.; BIONDO, L. M.; et al. Leishmania spp. in indigenous populations: a mini-review. **Frontiers in Public Health**, v. 10, p. 934653, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1033803>.

LARIOS, G.; RIBEIRO, M.; ARRUDA, C.; et al. Uma nova estratégia para diagnóstico de leishmaniose visceral canina baseada em espectroscopia e aprendizado de máquina, **J. Biophotonics**. v. 14, n. 11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbio.202100141>

LARSON, C. E. Tricologia. In: LARSON, C. E.; LUCAS, R. (Eds.), **Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária**. São Paulo: Interbook, 2016, Cap. 7, 853p.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 67, p. 13–23, 2009.

LIMA, C. A.; TEIXEIRA, K. R.; MOREIRA, J. P. F. F.; et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: uma revisão. **Pubvet**, v. 7, n. 25, 2013. DOI: <https://doi.org/10.22256/pubvet.v7n25.1641>.

- 1000 LIMA, C. C.; GRISOTTIB, M. Relação humano-animal e leishmaniose:
1001 repercussões no cotidiano de indivíduos inseridos em região endêmica. **Saúde**
1002 **Soc**, v. 27, n. 4, p. 1261-1269, 2018. DOI: [https://doi.org/10.1590/S0104-](https://doi.org/10.1590/S0104-12902018170934)
1003 12902018170934.
- 1004
- 1005 LIPPI, G.; PLEBANI, M.; FAVALORO, E. J. Interference in coagulation testing:
1006 focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. **Seminars in Thrombosis and**
1007 **Hemostasis**, v. 39, n. 3, p. 258–266, 2013. DOI: 10.1055/s-0032-1328972.
- 1008
- 1009 LUCIANO, R. M., LUCHEIS, S. B., TRONCARELLI, M. Z., LUCIANO, D. M., &
1010 LANGONI, H. (2009). Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de
1011 *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica
1012 de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research**
1013 **and 45 Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 181–187. DOI:
1014 <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2009.26765>.
- 1015
- 1016 MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; et al. Mecanismos de
1017 resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6,
1018 647–662, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0365-05962004000600002>.
- 1019
- 1020 MAIA, L. S. **Leishmaniose Visceral Canina: Aspectos clínicos e**
1021 **hematológicos de casos suspeitos e confirmados atendidos no Hospital**
1022 **Veterinário da Universidade de Brasília em 2011**. 2013. 43f. Trabalho de
1023 Conclusão de Curso (Graduação). Faculdade de Agronomia e Medicina
1024 Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- 1025
- 1026 MAIA, C., & CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and
1027 immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274–287,
1028 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.028>.
- 1029
- 1030 MESQUITA, R. A., ANZAI, E. K., OLIVEIRA, R. N., et al. Avaliação de três
1031 métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA

- 1032 genômico pela técnica da PCR. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15, n. 4, p.
1033 314–318, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-74912001000400008>
1034
- 1035 MUNFORD ND. **Alterações histopatológicas em cães com Leishmaniose**
1036 **Visceral naturalmente infectados do município de Jequié-BA (Brasil)**. 2016.
1037 93f. Tese (Dissertação de Mestrado) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz,
1038 Faculdade de Medicina, Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal da Bahia,
1039 Salvador.
1040
- 1041 NISHIDA, L. H. G.; DELMASCHIO, I. B. Leishmaniose visceral canina – revisão
1042 de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 1, n. 2, p. 07–15,
1043 2017.
1044
- 1045 NOGUEIRA MS, BARRETO AL, FURUKAWA M, ROVAI ES, BASTOS A,
1046 BERTONCELLO G, L. FCS CARVALHO, Espectroscopia FTIR como ferramenta
1047 de diagnóstico point of care para diabetes e periodontite: uma abordagem de
1048 análise de saliva. **Photodiagn. Potodyn.** v. 40, p. 103036, 2022. DOI:
1049 <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103036>.
1050
- 1051 OPS. Organización Panamericana de La Salud. **Manual de procedimientos para**
1052 **vigilancia y control de las leishmaniasis em las Américas**. Washington, D.C.:
1053 OPS; 2019.
1054
- 1055 PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DAY, M. J. One Health: the global challenge of
1056 epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 197,
1057 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-197>.
1058
- 1059 PEPE, M. S.; ETZIONI, R.; FENG, Z.; et al. Phases of Biomarker Development for
1060 Early Detection of Cancer. **Jnci Journal Of The National Cancer Institute**, v. 93,
1061 n. 14, p. 1054–1061, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/93.14.1054>.
1062
- 1063 PERINOTO, A. C. **Estudo da infecção por *Leishmania (Leishmania)***
1064 ***amazonensis* em camundongos BALB/c com deficiência na produção de**

óxido nítrico: aspectos imunopatológicos e avaliação da resposta imune humoral e celular. 2010. 132 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

QUEIROZ, N. N. M. G. P.; ASSIS, J. DE; OLIVEIRA, T. T. M. F. S.; et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 32–38, 2023.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21-5, Jan 2007. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.02029-06>.

REZENDE, B. S.; FRANÇA, T.; PAULA, M. A. B. de; et al. Turning chaotic sample group clusterization into organized ones by feature selection: Application on photodiagnosis of *Brucella abortus* serological test. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 247, p. 112781, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2023.112781>.

RINNAN, A.; VAN DEN BERG, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **TrAC – Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201–1222, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.07.007>.

ROCHA, T. M. A.; SOARES, N. P.; BOMBONATTO, N. G., et al. Alterações renais em cães diagnosticados com leishmaniose Visceral Canina em Patos de Minas (MG). **Animal em Foco**. v. 2, p. 70-79, 2022. Disponível em: <https://revistas.unipam.edu.br/index.php/revistaanimalemfoco/article/view/3158/>.

SERRANO, A.C.M.; NUNES, C.M.; SAVANI, E.S.M.; et al. Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba, SP – relato de caso. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 13, n.76, p.36-40, 2008.

- 1098 SILVA, D.A.; MADEIRA, M.F.; TEIXEIRA, A.C.; et al. Laboratory tests performed
1099 on Leishmania seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control
1100 program. **Veterinary Parasitology**, v. 179, p. 257-61, 2011. DOI:
1101 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.048>.
1102
- 1103 SILVA, F. L.; OLIVEIRA, M. C.; COSTA, M. R. Aplicação de métodos
1104 espectroscópicos no diagnóstico de infecções caninas por Leishmania infantum.
1105 **Journal of Veterinary Science and Technology**, v. 12, n. 1, p. 45–52, 2020.
1106
- 1107 SILVA, P. L.; ALVES, T. L.; TEIXEIRA, P. N.; et al. Epidemiologia da
1108 Leishmaniose visceral em um município da Bahia. **Rev. Saúde.Com.**, v.13, n.3, p.
1109 933-940, 2017. DOI: <https://doi.org/10.22481/rsc.v13i3.463>.
1110
- 1111 SOUSA, R. A.; ALVES, N. M.; ALBANO, S. G. C.; et al. Teste rápido
1112 imunocromatográfico no diagnóstico da Leishmaniose visceral canina no
1113 município de Bom Jesus, Piauí. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 19, p. 1733–
1114 1740, 2014.
1115
- 1116 SOUZA, C. S. F.; SILVA, V. L. A.; LABARTHE, N. Evaluation of DPP® and
1117 SNAP® Rapid Tests for diagnosis of Leishmania infantum canine infections.
1118 **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, e20190154,
1119 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0154-2019>.
1120
- 1121 SOUZA, Y. C. P.; CARVALHO, A. F. S.; CARVALHO, L. A. R.; et al. Testes
1122 diagnósticos para leishmaniose visceral: atualidade e perspectivas. **Revista**
1123 **Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 11, n. 21, p. 1–16. 2013.
1124 Disponível em:
1125 [https://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/jMGetvi4ZMFD9rK](https://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/jMGetvi4ZMFD9rK_2013-8-14-17-14-35.pdf)
1126 [_2013-8-14-17-14-35.pdf](https://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/jMGetvi4ZMFD9rK_2013-8-14-17-14-35.pdf).
1127
- 1128 STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Conceitos Introdutórios. In: ____ **Fundamentos**
1129 **de Patologia Clínica Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Gen & Guanabara
1130 Koogan, 2011. 748 p., cap 3.

- TABBASUM, S.; MAJEED, M. I.; NAWAZ, H.; et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for comparison of serum samples of typhoid and tuberculosis patients of different stages. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 35, 2021, p. 102426. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102426>.
- TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Gen & Guanabara Koogan, 2016. 3789 p.
- TRAVI, B. L., CORDEIRO-DA-SILVA, A., DANTAS-TORRES, F., et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, e0006082, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006082>.
- ULIANA, S. R. B., AFONSO, M. O., SHAW, J. J. O Gênero *Leishmania* e as Leishmanioses. FERREIRA, Marcelo Urbano. **Parasitologia Contemporânea**. 2. ed. São Paulo: Gen & Guanabara Koogan, 2021. 1017 p., cap. 07.
- URQUHART, G. M, ARMOUR, J, DUNCAN, JL, DUNN, AM, JENNINGS, FW. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Scotland: Guanabara Koogan S. A., 1998. 273 p.
- VARGAS, M.; MARIA, A. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil em 2022. **Peer Review**, v. 5, n. 11, p. 294–305, jun. 2023.
- VIERA, A. N. L. S. **Biomarcadores de lesão renal no diagnóstico precoce e monitoração da lesão renal aguda na erliquiose monocítica canina**. 2022. 145 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2022.
- VIEIRA NETO, F. A.; SOUSA, A. K. S.; MARQUES, M. V.; et al. Avaliação dos parâmetros bioquímicos em cães infectados por *Leishmania chagasi*. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 13, n. 2, p. 131–140, 2011. DOI: <https://doi.org/10.18764/>.

XU, F.; WANG, X.; XU, H. et al. A study of structural differences between TBM patients' and non-TBM persons' CSF using UV-Vis absorption spectroscopy.

Journal of Molecular Structure. v. 1103, p. 183-186. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.09.028>.

ZORZETTO, R. **Uma doença anunciada. Infecção letal causada por parasita de uma só célula, a leishmaniose visceral avança sobre as cidades brasileiras.** Pesquisa Fapesp, São Paulo, n.151, p.47-51, 2008.

ZORZO, CAROLINA; PEREIRA, NATHALIA A.; HONGYU, KUANG; AGUIAR, Daniel M. *Correlation between canine biochemical analytes and TRP36 ELISA seropositivity for Ehrlichia canis in Brazil.* **Veterinary Clinical Pathology**, v. 52, n. 4, p. 621–627, dez. 2023. DOI: 10.1111/vcp.13277.

ALUM, M. F.; et al. 4,4-Dimethyl-4-silapentane-1-ammonium trifluoroacetate (DSA), a promising universal internal standard for NMR-based metabolic profiling studies of biofluids, including blood plasma and serum. **Metabolomics**, v. 4, n. 2, p. 122–127, 2008.

PSYCHOGIOS, N.; et al. The Human Serum Metabolome. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e16957, 2011.

ETZIONI, R.; et al. The case for early detection. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 4, p. 243–252, 2003.

GARNETT, M. J.; et al. Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. **Nature**, v. 483, n. 7391, p. 570–575, 2012.

BELLISOLA, G.; SORIO, C. Infrared Spectroscopy and Microscopy in Cancer Research and Diagnosis. **American Journal of Cancer Research**, v. 2, n. 1, p. 1–21, 2012.

- 1197 PEPE, M. S.; et al. Phases of Biomarker Development for Early Detection of
1198 Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 14, p. 1054–1061,
1199 2001.
- 1200
- 1201 DUNN, B. K.; JEGALIAN, K.; GREENWALD, P. Biomarkers for Early Detection
1202 and as Surrogate Endpoints in Cancer Prevention Trials: Issues and
1203 Opportunities. **Recent Results in Cancer Research**, p. 21–47, 2010.
- 1204
- 1205 RINNAN, Å.; VAN DEN BERGS, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most
1206 common preprocessing techniques for near-infrared spectra. **TrAC Trends in**
1207 **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 1201–1222, 2009.
- 1208
- 1209 JOLLIFFE, T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent
1210 developments. Philosophical Transactions of the Royal Society A: **Mathematical,**
1211 **Physical and Engineering Sciences**, v. 374, p. 20150202, 2016.
- 1212
- 1213 LARIOS, G.; NICOLODELLI, G.; RIBEIRO, M.; CANASSA, T.; REIS, A. R.;
1214 OLIVEIRA, S. L.; ALVES, C. Z.; MARANGONI, B. S.; CENA, C. Soybean seed
1215 vigor discrimination by using infrared spectroscopy and machine learning
1216 algorithms. **Analytical Methods**, v. 12, p. 4303–4309, 2020.
- 1217
- 1218 T.T. WONG, Performance evaluation of classification algorithms by k-fold and
1219 leave-one-out cross validation, **Pattern Recogn.** 48 (2015) 2839–2846.