

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

IARA HELENA DOMINGOS

**TESTE RÁPIDO TR-DPP[®] NO CONTEXTO DO DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

**RAPID TEST TR-DPP[®] IN THE CONTEXT OF SEROLOGICAL
DIAGNOSIS OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS**

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL**

Maio – 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

IARA HELENA DOMINGOS

**TESTE RÁPIDO TR-DPP[®] NO CONTEXTO DO DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

**RAPID TEST TR-DPP[®] IN THE CONTEXT OF SEROLOGICAL
DIAGNOSIS OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre. Área concentração: Saúde Animal

Orientação: Prof^ª Dr^ª Ana Luiza Alves Rosa Osório

Coorientação: Prof^ª Dr^ª Veronica Jorge Babo-Terra

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL

Maio – 2012

IARA HELENA DOMINGOS

**TESTE RÁPIDO TR-DPP® NO CONTEXTO DO DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

**RAPID TEST TR-DPP® IN THE CONTEXT OF SEROLOGICAL
DIAGNOSIS OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre

Área concentração: Saúde Animal

APROVADA: 22/05/12



Profª. Dra. Ana Luiza Alves Rosa Osório
Orientadora



Profª. Dra. Maria Elizabeth M. Cavalheiros Dorval



Profª. Dra. Cleusa A. Theodoro Rodrigues

Dedico este trabalho à Silvia, minha
companheira e amiga, por sua ajuda e apoio
incondicional nos bons e nos maus momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiro a DEUS, pois sem Ele nada posso.

À minha querida mãe, Maria Luiza Domingos, pois tudo na minha vida devo a ela.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Luiza Alves Rosa Osório pela paciência e dedicação durante a execução deste trabalho.

À minha coorientadora Prof^a Dr^a Verônica Babo-Terra pela ajuda e incansáveis correções.

À minha amiga e Coordenadora do Centro de Controle de Zoonoses Prof^a Dr^a Julia Maksoud Brazuna pelo apoio e incentivo.

À amiga Maria Aparecida Conche Cunha pela paciência e apoio nos momentos que estive ausente de nossas atividades no CCZ.

Aos colegas de sala, Cecy Fialho, Greff Willians, Maria Eugênia Belchior e Maria Luiza pelo incentivo.

Às médicas veterinárias e amigas Elisabete Friozi, Juliana Rezende Araújo e Ana Paula Nogueira pelas coletas de materiais realizadas.

À equipe do Laboratório do Centro de Controle de Zoonoses, responsáveis pelo preparo e realização dos exames laboratoriais: Andréa Rúbia, Elisa Córdoba, Gilberto Marinho, Gleyciane Menezes, Kelly Rojas, Mariana Pereira e Rosemare Gomes.

À equipe do CCZ que tanto auxiliou na coleta de materiais e tabulação dos dados: Adriano Trizzoti, Carmen Rosset, Carmen Marcia Crepaldi, Deives Stroppa, Diego Ricardo, Douglas Cáceres, Iranor Rodrigues, Roberval Venino, Rosiene França e Suellen Pereira.

Ao Prof Dr Manoel Sebastião da Costa Lima-Junior pela contribuição na realização do diagnóstico molecular.

Ao médico veterinário Antonio Francisco de Souza Filho pelos trabalhos realizados no Laboratório de Biologia Molecular da UFMS.

A todos que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

DOMINGOS, I. H. Teste rápido TR-DPP[®] no contexto do diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina. 2012. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

A leishmaniose visceral americana, causada pela *Leishmania (L.) infantum chagasi*, representa um grave problema de saúde pública no Brasil, com caráter endêmico e em franca expansão. A transmissão ocorre por fêmeas de flebotomíneos. O cão, considerado o reservatório doméstico da doença, desempenha importante papel devido ao parasitismo de pele e a proximidade com o homem, sendo uma das medidas de controle da doença adotadas pelo Ministério da Saúde, a detecção sorológica de animais infectados e sua posterior eliminação. O protocolo de diagnóstico vigente utiliza o ELISA-Bio-Manguinhos como teste para triagem e a IFI-Bio-Manguinhos como confirmatório. Dentre os problemas citados quanto ao diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina, estão a baixa sensibilidade em animais assintomáticos e as reações cruzadas, principalmente com *Ehrlichia canis*. Novas tecnologias têm surgido para o diagnóstico da LVC, dentre elas o teste rápido *Dual Path Platform* (TR-DPP[®]-Bio-Manguinhos), que a partir de 2012 fará parte do protocolo de diagnóstico da doença como triagem e o ELISA-Bio-Manguinhos como teste confirmatório. O primeiro estudo teve como objetivos avaliar a sensibilidade dos testes (IFI, ELISA e TR-DPP[®]) isoladamente, e comparar o protocolo de diagnóstico vigente (ELISA seguido da IFI) com o proposto (TR-DPP[®] seguido do ELISA), em amostras de cães assintomáticos com exame parasitológico positivo. Concluiu-se que a IFI identificou o maior número de cães infectados, seguida do ELISA e o TR-DPP[®] que tiveram desempenhos equivalentes, e que o protocolo proposto não apresentou diferença significativa no número de animais diagnosticados em relação ao vigente, com concordância boa entre eles segundo classificação Kappa. O segundo estudo teve como objetivo analisar a possível interferência da infecção por *Ehrlichia canis* no diagnóstico TR-DPP[®] e concluiu-se por meio de análise estatística que não há associação entre ter mórulas de *Ehrlichia canis* e apresentar reação positiva no teste sorológico TR-DPP[®]. A PCR para o gênero *Leishmania* realizada nas amostras com TR-DPP[®] positivo, sem encontro de amastigotas e com presença de mórulas, ratificou a inexistência de associação entre a presença de mórula e resultado positivo no TR-DPP[®].

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Leishmania*. Métodos diagnósticos. Cães. Erliquiose

ABSTRACT

DOMINGOS, I. H. Rapid test TR-DPP[®] in the context of serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis. 2012. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

American visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* represents a serious public health problem in Brazil, with endemic character and on expansion. Transmission occurs by female phlebotomine sandflies. The dog, considered the domestic reservoir of the disease plays an important role due to the parasitism of skin and proximity to the man. One of the disease control measures adopted by the Ministry of Health is the serological detection of infected animals and their subsequent elimination. The current diagnostic protocol uses the ELISA-Bio-Manguinhos as test for screening and IFIs-Bio-Manguinhos as confirmatory. Among the problems cited for the serological diagnosis of visceral leishmaniasis are the low sensitivity in asymptomatic animals and cross reactions mainly with *Ehrlichia canis*. New technologies have emerged for the diagnosis of CVL, among them the quick test Dual Path Platform (DPP-TR[®]-Bio-Manguinhos), that from 2012 on will be part of the official protocol for diagnosis of the disease, as screening and ELISA-Bio-Manguinhos as confirmatory test. The objectives of the first study were to assess the sensitivity of tests (IFI, ELISA and TR-DPP[®]) alone, and to compare the existing diagnostic protocol (ELISA followed by IFI) with the proposed one (TR-DPP[®] followed by ELISA) in samples of asymptomatic dogs with positive parasitological examination. It was concluded that IFI has identified the largest number of infected dogs, followed by ELISA and TR-DPP[®] which had equivalent results, and that the performance of the proposed protocol did not provide any significant difference in number of animals diagnosed in relation to the existing protocol, with a good accordance between them regarding Kappa classification. The aim of the second study was to determine the possible influence of infection with *Ehrlichia canis* in TR-DPP[®] and it was concluded by means of statistical analysis that there is no association between presenting *Ehrlichia canis* morulae and a positive serological reaction in TR-DPP[®] test. The PCR of the genus leishmania held in TR-DPP[®] positive samples that showed negative parasitological results but with the presence of morulae confirmed the lack of association between the presence of morulae and the positive result in TR-DPP[®].

INDEXING TERMS: *Leishmania*. Diagnostic methods. Dogs. Ehrlichiosis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A2** – Antígeno recombinante A2
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- ELISA** – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
- EMC** – Erliquiose monocítica canina
- E. canis*** – *Ehrlichia canis*
- FML** – Ligante de fucose e manose
- HIV** – Vírus da imunodeficiência humana
- IFI** – Imunofluorescência Indireta
- Ig** – Imunoglobulina
- IgG** – Imunoglobulina da classe G
- IL-2** – Interleucina dois
- IL-4** – Interleucina quatro
- IL-10** – Interleucina dez
- INF-gama** - Interferon gama
- kDa** - Kilodaltons
- kDNA** – Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto
- LV** – Leishmaniose visceral
- LVA** – Leishmaniose visceral americana
- LVC** – Leishmaniose visceral canina
- L. chagasi*** – *Leishmania chagasi*
- L. donovani*** – *Leishmania donovani*
- L. infantum*** – *Leishmania infantum*
- L. major*** – *Leishmania major*
- L. (Leishmania) amazonensis*** – *Leishmania (Leishmania) amazonensis*
- L. (Leishmania) donovani*** – *Leishmania (Leishmania) donovani*
- L. (L.) chagasi*** – *Leishmania (Leishmania) chagasi*
- L. (L.) infantum*** – *Leishmania (Leishmania) infantum*
- L. (V.) guyanensis*** – *Leishmania (Viannia) guyanensis*
- L. (V.) lainsoni*** – *Leishmania (Viannia) lainsoni*
- L. (V.) naiff*** – *Leishmania (Viannia) naiff*
- L. (V.) shawi*** – *Leishmania (Viannia) shawi*
- L. (V.) lindenbergi*** – *Leishmania (Viannia) lindenbergi*

Lu. longipalpis – *Lutzomyia longipalpis*

Lu. cruzi – *Lutzomyia cruzi*

Lu. evansi – *Lutzomyia evansi*

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS – Ministério da Saúde

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCLV – Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

PCR – Reação em cadeia da polimerase

rk26 – Antígeno recombinante k26

rk28 – Antígeno recombinante k28

rk39 – Antígeno recombinante k39

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

SDS – Sulfato dodecil sódico

SMF – Sistema mononuclear fagocitário

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

Th1 – Células T *helper* padrão 1

TMB – Tetrametilbenzina

Th2 – Células T *helper* padrão 2

TNF- α – Fator de necrose tumoral tipo α

TRALd – Teste rápido com anticorpo *Leishmania donovani*

TR-DPP[®] - Teste rápido *Dual Path Platform*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Histórico	14
2.2	Ecologia e epidemiologia	16
2.3	Agentes etiológicos	19
2.4	Vetor.....	21
2.5	Ciclo biológico	22
2.6	Leishmaniose visceral canina (LVC)	24
2.7	Diagnóstico da leishmaniose visceral canina	31
2.8	Erliquiose	41
3	OBJETIVOS	43
	REFERÊNCIAS	44
	Artigo 1	60
	Teste rápido TR-DPP® em inquéritos sorológicos para leishmaniose visceral canina na região Centro Oeste do Brasil	61
	Artigo 2	74
	Interferência da infecção por <i>Ehrlichia canis</i> no teste sorológico TR-DPP®	75

1 INTRODUÇÃO

Leishmanioses são infecções causadas por espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, que infectam a espécie humana nas regiões tropicais e subtropicais do Velho e do Novo Mundo causando alterações no Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM). São principalmente transmitidas por fêmeas de insetos dípteros conhecidos como flebotomíneos (Psychodidae: Phlebotominae), causando um espectro de manifestações clínicas em humanos, com apresentação nas formas visceral, tegumentar e mucosa (GRIMALDI; TESH, 1993; DESJEUX, 2004).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica a leishmaniose como a segunda protozoonose mais importante da atualidade estando entre as seis principais enfermidades infecto-parasitárias do mundo. Está em expansão nos últimos 20 anos, com aumento do número de casos de todas as suas formas, que são endêmicas nos cinco continentes, distribuídas em 88 países localizados em regiões tropicais e subtropicais, totalizando 350 milhões de pessoas sob o risco de contraírem essa infecção a cada ano (WHO, 2010). A incidência anual é estimada em 1-2 milhões de novos casos dos quais 600 mil são oficialmente notificados na forma visceral (Leishmaniose Visceral Americana / LVA), o que mostra elevada taxa de subnotificação (DESJEUX, 2004), sendo que na América do Sul é considerada uma zoonose de caráter endêmico e com ampla distribuição geográfica (MAURÍCIO; STOHARD; MILES, 2000).

As leishmanioses representam um sério problema com impacto negativo para a saúde pública, com reflexos inclusive na economia, quer pela mortalidade na forma visceral ou pelos aspectos mutilantes na forma cutâneo-mucosa (BRASIL, 2003).

No Brasil, as leishmanioses caracterizam-se como enfermidades emergenciais em franca expansão. A Portaria Ministerial nº 1943 de 18 de outubro de 2001, determina a doença como um agravo de notificação compulsória em todo o território nacional. As formas tegumentares foram notificadas em 27 unidades federadas brasileiras, e casos autóctones de LVA foram notificados nas regiões Nordeste, Norte, Centro-Oeste e Sudeste (BRASIL, 2006), e mais recentemente na Região Sul (CEVS, 2009). Dos 78 municípios do Mato Grosso do Sul, 56 registram ocorrência de casos de LV (MATO GROSSO DO SUL, 2011).

Sendo doenças metaxênicas, causadas por parasitos multi-hospedeiros que interagem em complexas relações em diferentes ambientes, o conhecimento dos insetos vetores e dos hospedeiros mamíferos nos ciclos enzoóticos e zoonóticos é fundamental para se conhecer a

epidemiologia das leishmanioses e estabelecer medidas de controle adequadas para cada região (ASHFORD, 2000; RANGEL; LAINSON, 2003).

Nos países onde a LV se comporta como zoonose, o cão é considerado o principal reservatório doméstico visto ser a principal fonte de infecção para a *Leishmania chagasi* e viver no mesmo ambiente que o homem (DANTAS-TORRES, 2007). A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos, de forma que a infecção nessa espécie tem sido mais prevalente do que no homem (GONTIJO; MELO, 2004).

Existem problemas com relação ao diagnóstico, sendo atribuída aos testes sorológicos a dificuldade de distinguir entre infecção e doença, uma vez que a sensibilidade e especificidade são bastante discutíveis não havendo concordância entre testes parasitológicos, imunohistológicos e moleculares, além de reações cruzadas com outras patologias (DOURADO et al., 2007).

Há consenso entre os pesquisadores que um teste eficaz deveria ser capaz de confirmar uma suspeita clínica em um paciente, detectar a infecção em cães assintomáticos, ter alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, deve ser simples e de fácil execução, de baixo custo, viável em laboratórios ou adaptáveis para condições de campo, e principalmente detectar todos os cães infectados com *Leishmania* utilizando a coleta não invasiva de amostras biológicas (COURTENAY et al., 2002; DOURADO et al., 2007; MAIA; CAMPINO, 2008).

Dentre as principais desvantagens dos testes sorológicos estão a incapacidade de detectar cães infectados antes da soroconversão e a possibilidade de ocorrer reações cruzadas para com diversas outras enfermidades que infectam os cães (HARRUS, 2002; FEITOSA, 2006; IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006; LEAL, 2009; LUCIANO et al., 2009; LOPES et al., 2011; SILVA et al., 2011).

Das enfermidades incriminadas como possíveis causadoras de reações cruzadas, a erliquiose monocítica canina, endêmica na maioria dos estados brasileiros, apresenta alterações clínicas e hematológicas semelhantes à leishmaniose visceral canina (GOMES; CORDEIRO, 2004; FEITOSA et al., 2006; OLIVEIRA T. et al., 2008; VIEIRA et al., 2011).

O desenvolvimento de testes rápidos baseados em proteínas recombinantes (rk26 e rk39) para uso em testes de diagnóstico revolucionou o diagnóstico da leishmaniose visceral (LV), provando ser altamente sensível e específico, determinando o diagnóstico preciso da doença (CHAPPUIS et al., 2007). O teste rápido *Dual Path Platform* (TR-DPP® - Leishmaniose Visceral Canina), patenteado pela Chembio Diagnostics e desenvolvido pelo Instituto Biomanguinhos/Fiocruz (FUNED, 2010), trata-se de um ensaio imunocromatográfico de triagem que emprega de um lado, a combinação de proteína A

conjugada a partículas de ouro coloidal, e de outro, antígenos recombinantes específicos de *Leishmania* ligados a uma membrana de nitrocelulose. Se houver a presença de anticorpos anti-leishmania na amostra testada, estes reagirão com os antígenos recombinantes k28, e em sequência se ligarão à combinação de proteína A e ouro coloidal, fornecendo o resultado positivo por meio de reação de cor. As vantagens são rapidez de execução, simplicidade e fácil uso, podendo ser executado a campo (BIO-MANGUINHOS, 2011).

Segundo Nota Técnica do Ministério da Saúde (MS), Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis de dezembro de 2011, o teste rápido imunocromatográfico - TR-DPP[®]-Bio-Manguinhos passará a ser o teste de triagem nos inquéritos caninos e o Ensaio imunoenzimático (ELISA), o teste confirmatório, com implantação gradual até o final de 2012 (BRASIL, 2011).

Os objetivos deste estudo foram analisar o desempenho dos testes sorológicos (ELISA, IFI e TR-DPP[®]) isoladamente em amostras de cães assintomáticos em área endêmica de leishmaniose visceral; realizar a comparação entre o protocolo de diagnóstico da LVC vigente, ELISA seguido da IFI e o proposto, TR-DPP[®] seguido do ELISA, como testes de triagem e confirmatório respectivamente. E ainda, analisar a possível interferência da infecção por *Ehrlichia canis* nos resultados do teste TR-DPP[®] para LVC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

A leishmaniose visceral (LV) tornou-se conhecida após Dr. Willian Leishman, médico escocês que servia o exército britânico na Índia, diagnosticar em 1901, os primeiros casos da doença. Também denominada de Calazar ou *Kala-zar*, já despertava atenção dos médicos ocidentais desde 1824 em Jessore, Índia (hoje Bangladesh), onde inicialmente acreditava ser uma forma clínica da malária. Calazar é um termo derivado de *Kala*, uma palavra de origem hindu que significa negro em sânscrito (Assamês) e *azar*, sufixo de origem Persa que significa febre. O calazar tem várias outras denominações: leishmaniose visceral, febre de dum-dum, febre de assam, febre caquecial, esplenomegalia tropical, anemia esplênica dos lactentes e febre negra indiana. Os gregos no século XIX a chamavam de *ponos* ou *haplopinakon*. Em 1880 no sul da Itália, surgiram observações acerca de uma doença que era chamada de “anemia esplênica infantil”, referência clara ao calazar. Antes disso, o médico italiano Tommaso Cigliano fez observações sobre o calazar. Em 1894, alguns anos antes de Leishman, o médico italiano Pianese observou e descreveu corpúsculos endocelulares: as leishmanias (WHO, 2001).

Os primeiros relatos da doença causada pelo parasito do gênero *Leishmania* no Novo Mundo remontam do período Inca e da colonização espanhola, quando era mencionada a presença de lesões cutâneas em agricultores que circulavam na região dos Andes (WHO, 2004).

Cunnigham, médico militar escocês, em 1885, descreveu o calazar como se tratando de uma afecção parasitária. As descrições anteriores a Cunnigham não são confiáveis, pois se confundiam com outras doenças, principalmente, malária. Ele foi o primeiro a estudar o agente etiológico da doença ao descrever formas amastigotas, no entanto, sem ter conhecimento de seu mecanismo de transmissão (WHO, 2004).

A primeira descrição oficial do parasito foi feita na Índia por William Boog Leishman em 1900, que identificou formas amastigotas do parasito em esfregaço de baço de um soldado britânico morto que apresentara disenteria e hepatoesplenomegalia, reconhecendo a semelhança deste protozoário com as formas arredondadas do gênero *Trypanosoma* (WHO, 2001).

Em 1903, Charles Donovan confirmou os achados de Leishman, observando baços de cadáveres ditos falecidos de malária crônica. Porém, confundiu-o com o *Trypanosoma brucei*,

causador da doença do sono, já descrito em 1894 por David Bruce. Mas foi Major Ross em 1903, que descobriu, com base nos achados anteriores, que os organismos evidenciados na preparação de Donovan não eram esporozoários como este havia pensado e lhes estabeleceu um novo gênero, o gênero *Leishmania*. Assim, o nome correto do agente etiológico do calazar ficou sendo *Leishmania donovani* (ROSS, 1903).

Como o calazar na região do Mediterrâneo atingia principalmente crianças, as evidências de diferenças entre o organismo causador do calazar de uma região para outra justificaram o estabelecimento da espécie *Leishmania infantum* por Charles Nicolle em 1908. No mesmo ano, Nicolle estudou a relação dos cães com a doença, demonstrando que eles eram hospedeiros intermediários. Em 1924, R. Knowles, L. Napier e R. Smith identificaram as herptomonas no intestino do *Phlebotomus argentipis*. Em 1931, foi possível elucidar seu mecanismo de transmissão, pela observação da infecção em *hamster* por meio de insetos da família dos flebotomíneos. A data oficial dessa descoberta se refere ao ano de 1942, que foi quando se comprovou definitivamente a transmissão ao homem pelo *Phlebotomus argentipis* (LAINSON; SHAW, 1987).

A primeira suspeita da existência de calazar nas Américas ocorreu em 1913, no Paraguai, quando Migone encontrou “corpúsculos” semelhantes às leishmanias no sangue periférico de um paciente febril. Contudo, Migone não confirmou o diagnóstico da doença *post-mortem*. Apenas treze anos mais tarde, Mazza e Cornejo (1926) puderam confirmar a autoctonia da leishmaniose, quando identificaram, parasitologicamente, dois casos em crianças na Argentina (LAINSON; SHAW, 1987).

No Nordeste do Brasil, Henrique Penna em 1934, observou formas amastigotas do parasito em lâminas histológicas do fígado de pacientes durante pesquisas sobre a epidemiologia da febre amarela. A partir de então, foi criada uma comissão para estudar a LV no Brasil, tendo à frente o Dr. Evandro Chagas, do Instituto de Manguinhos (Rio de Janeiro), sendo o primeiro a observar a doença no cão e no homem. Em 1937, Cunha e Chagas estabeleceram o agente etiológico no Brasil, pela denominação de *Leishmania chagasi* e como vetor provável da doença, o *Phlebotomus longipalpis* (BADARÓ; DUARTE, 1996).

Em 1956, Deane aponta o cão e a raposa como reservatórios naturais do parasito em áreas endêmicas e caracteriza a doença com zoonose (DEANE, 1956).

Existem suposições de que o primeiro caso humano autóctone dessa parasitose no Continente Americano registrado em 1911, tenha sido proveniente da região de Porto Esperança no município de Corumbá, visto os registros de que um imigrante italiano que vivera em Santos/SP e após viajar para Mato Grosso apresentou os primeiros sinais da

doença, e teve o diagnóstico no Paraguai (MIGONE, 1913). Na década de 40 foram registrados dois casos humanos, uma criança em Rio Brillhante, e um adulto que trabalhava na ferrovia Bolívia-Brasil, em Corumbá (ARRUDA et al., 1949).

A partir de 1980, em Corumbá, Mato Grosso do Sul, foram notificados os primeiros casos humanos de LV, que aliados à constatação de cães com aspectos sugestivos da doença, estimularam estudos na área com o intuito de esclarecer os componentes epidemiológicos da leishmaniose na região. Nesta época, a infecção canina já estava disseminada e foi diagnosticada em 8,7% de 481 cães examinados, sendo que o parasito isolado foi *Leishmania chagasi*, constituindo a primeira confirmação parasitológica do estado (NUNES et al., 1988). A doença permaneceu restrita nesta área até 1995 e, a partir de então, iniciou a sua expansão para os municípios adjacentes, de forma que em 1999 já abrangia 11 municípios, dentre os quais Aquidauana e Anastácio, distantes de Corumbá 270 km (CORTADA et al., 2004).

Em 2005, a doença foi notificada em 25 municípios do estado e, em 2007, os municípios de Campo Grande, Três Lagoas, Aquidauana, Corumbá, Anastácio e Jardim foram classificados como de transmissão intensa. Terenos, Miranda, Ribas do Rio Pardo foram classificados como de transmissão moderada, e outros 31 como de transmissão esporádica, totalizando 41 atingidos pela leishmaniose de 78 municípios (MATO GROSSO DO SUL, 2007). Em 2011, desse total de municípios do estado, 56 já registraram a ocorrência de casos de LV (MATO GROSSO DO SUL, 2011).

A partir de 2000 observou-se um incremento no número de casos diagnosticados em Campo Grande e Três Lagoas. As primeiras notificações de LV humana autóctone na capital Campo Grande foram confirmadas em 2002. Naquele ano Campo Grande registrou 19 casos da doença (ANTONIALLI, 2006) e 100 e 136 em 2003 e 2004, respectivamente (CAMPO GRANDE, 2006), confirmando o caráter endêmico e de expansão da doença.

2.2 Ecologia e epidemiologia

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a leishmaniose visceral está entre as seis principais enfermidades infecto-parasitárias mais importantes do mundo dado a sua incidência, alta mortalidade em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, e emergência em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (WHO, 2010).

A doença tem ampla distribuição ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, África e nas Américas, onde também é denominada leishmaniose visceral americana (LVA)

ou calazar neo-tropical (BRASIL, 2006). São endêmicas nos cinco continentes, distribuídas em 88 países localizados em regiões tropicais e subtropicais, dos quais 72 são classificados como países em desenvolvimento, sendo que somente em 32 países a notificação é obrigatória, totalizando 500 mil novos casos a cada ano, com 90% dos casos de leishmaniose visceral humana ocorrendo em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. Na América Latina a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que o Brasil é o que registra o maior número de casos, cerca de 90% do total notificado (WHO, 2010).

No Brasil, a LV é considerada atualmente uma doença emergente e reemergente, tanto em áreas rurais como em áreas urbanas. Inicialmente apresentava um caráter eminentemente de distribuição rural e em pequenos centros urbanos, e atualmente encontra-se em expansão em áreas urbanas de vários estados brasileiros, cujo padrão epidemiológico de transmissão começou a ser alterado a partir da década de 1980, quando uma epidemia de LV irrompeu em Teresina e posteriormente em São Luís (BRASIL, 2000).

A doença se expandiu para áreas urbanas de médio e grande porte, estando distribuída em 21 unidades federadas, tornando-se um crescente problema de saúde pública. O país tem registrado aumento nos casos de LV desde 1990, com letalidade média de 8% e com mudanças no seu padrão de transmissão. A LV apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados em função de sua ampla distribuição geográfica (BRASIL, 2006).

Em dezenove anos de notificação no Brasil (1984-2002), os casos de LV somaram 48.455 casos, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Porém, a doença se expandiu para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste, reduzindo a participação da região Nordeste no número de casos. Nos últimos dez anos, a média anual de casos no país foi de 3.156 casos, e a incidência de dois casos/1000.000 habitantes (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). A região Nordeste apresentou redução de casos de 83% em 2000 para 45% em 2008, e as regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste passaram de 17% para 48%, demonstrando a franca expansão da doença no país (BRASIL, 2010).

Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se os surtos ocorridos em Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém, (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e mais recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (BRASIL, 2006). Outro aspecto relevante a ser considerado, dentro do contexto de expansão e urbanização da LV em todo o mundo e principalmente no Brasil, é a possibilidade de se contrair a doença por

transfusão sanguínea. Este fato é agravado em função do diagnóstico sorológico não estar incluso na triagem dos doadores em todo o país (GONTIJO; MELO, 2004).

As transformações no ambiente provocadas pelo intenso processo migratório, por pressões econômicas ou sociais, a pauperização consequente das distorções da distribuição de renda, o processo de urbanização crescente, o esvaziamento rural e as secas periódicas acarretam a expansão das áreas endêmicas e o aparecimento de novos focos de LV. Este fenômeno leva à redução do espaço ecológico da doença, facilitando a ocorrência de epidemias. O ambiente característico e propício à ocorrência de LV é aquele de baixo nível sócioeconômico, pobreza e promiscuidade, prevalente em grande proporção no meio rural e na grande periferia das grandes cidades. Estas características vêm se modificando, principalmente nos estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste (BRASIL, 2006).

É consenso que esse processo desordenado de ocupação urbana resultou em condições precárias de vida e de destruição ambiental, e influenciou na emergência da doença no meio urbano, no qual por um lado o vetor *Lutzomyia longipalpis* se adaptou às condições peridomésticas de áreas depauperadas visto a abundância de matéria orgânica gerada por animais domésticos e as más condições sanitárias dos ambientes, e por outro, os cães abandonados vagando na periferia da cidade que podem ter sido infectados quando em contato direto com reservatórios silvestres, sendo amplificadores da infecção para outros cães e humanos (COSTA; TAPETY; WERNECK, 2007).

Rego Jr et al. (1983) já alertavam para a franca expansão e urbanização da LV no Mato Grosso do Sul. O processo de endemização com elevada incidência da doença no estado se apresentava preocupante necessitando-se de pesquisas voltadas ao seu manejo e controle.

Quanto aos dados de notificação dos casos, o estado no ano de 2000, notificou 82 casos com 5 óbitos; em 2001, 87 casos e 13 óbitos; 2002, 176 casos e 16 óbitos; 2003, 190 casos e 23 óbitos; 2004, 232 casos e 19 óbitos; 2005, 204 casos e 22 óbitos; 2006, 209 casos e 19 óbitos; 2007, 249 casos e 9 óbitos; 2008, 231 casos e 27 óbitos; 2009, 173 casos e 10 óbitos e 2010, 212 casos e 17 óbitos. A taxa de letalidade de LV variou de 14,9 em 2001 a 8,0 em 2010 (MATO GROSSO DO SUL, 2011).

Na capital, Campo Grande, o primeiro caso autóctone de LV canina foi registrado em 1998 (SILVA et al., 2000). No ano de 2002 foram confirmados 22 casos humanos com 02 óbitos. A partir de 2003 houve o aumento da incidência da doença em sua área urbana, de forma que em 2003 ocorreram 97 casos com 11 óbitos; em 2004, 129 casos com 7 óbitos; em 2005, 156 casos com 12 óbitos; em 2006, 163 casos com 11 óbitos; em 2007, 139 casos com

07 óbitos; em 2008, 144 casos com 13 óbitos; em 2009, 101 casos, com 7 óbitos e 2010, com 105 casos e 8 óbitos (CAMPO GRANDE, 2010).

Segundo Antonialli (2006), em pesquisa realizada sobre a ecoepidemiologia da leishmaniose visceral no estado do Mato Grosso do Sul, sua expansão e disseminação iniciou em 1998, e a doença inicialmente fora estabelecida nas áreas periféricas dos municípios seguindo-se a disseminação para as áreas mais centrais e/ou por toda a área urbana. Conclui ainda, que o início da expansão da doença coincide no espaço (rota) e no tempo com a migração de milhares de trabalhadores e o início da execução do projeto de construção do gasoduto Bolívia-Brasil; que a rota de expansão e disseminação da LV deu-se no sentido oeste para leste, de Corumbá para Três Lagoas, passando por Campo Grande; os municípios de Corumbá, Miranda, Aquidauana, Anastácio, Campo Grande, Ribas do Rio Pardo e Três Lagoas foram os que mais concentraram trabalhadores migrantes, compondo a rota principal da expansão da LVA, disseminando a doença a partir destes para os demais municípios sulmatogrossenses. Mencionou também, que é indispensável a realização de estudos que levem em consideração o impacto social, econômico e sanitário quando da elaboração, antes da aprovação e da execução de projetos que demandem o deslocamento ou a migração de grandes contingentes de trabalhadores de diferentes regiões, e que em Campo Grande o risco para a transmissão aumenta nas duas semanas que se seguem a uma semana com precipitações pluviométricas e durante as estações mais secas do ano. A autora finaliza afirmando que foi confirmada uma estreita relação no espaço e no número de casos confirmados entre a ocorrência de LV canina e humana.

2.3 Agentes etiológicos

Leishmania é um protozoário pertencente ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcodina, subfilos Mastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Apresenta várias formas morfológicas distintas. Agrupam-se nesse gênero cerca de 30 espécies, sendo aceito que aproximadamente 21 delas sejam patogênicas com capacidade de produzir alterações patológicas no homem (LAINSON; SHAW, 1987; ASHFORD, 2000).

Os protozoários da ordem Kinetoplastida possuem seu DNA localizado em duas estruturas: no núcleo (DNA cromossômico) e na mitocôndria ou cinetoplasto (kDNA). O kDNA está classificado em maxicírculos, 15% do DNA de toda a célula, presentes em 20 a 50 cópias por célula, e minicírculos, 35% do total de todo o DNA da célula, com 10.000 cópias

por célula que se replicam independentemente (SIMPSON; MOREL; SIMPSON, 1980; SHAPIRO; ENGLUND, 1995).

Todos os componentes deste grupo são reconhecidos como parasitos obrigatórios e heteroxênicos, pois apresentam necessidade de relacionamento com dois tipos de hospedeiros, um invertebrado (dípteros hematófagos da família Psychodidae) e um vertebrado (canídeos, marsupiais, roedores ou humanos) para realizar o seu ciclo biológico (LAINSON; SHAW, 1987).

As duas formas evolutivas observadas no ciclo de vida de *Leishmania* spp. dependem do hospedeiro. Quando no inseto vetor, a forma promastigota presente em seu tubo digestório é extracelular, fusiforme, tem 5-20 µm de comprimento e 1-4 µm de largura e apresenta flagelo que lhe confere mobilidade (ROZE, 2005). Quando no vertebrado, a forma amastigota se apresenta com formato ovoide ou redondo, com 2,5-5 µm de comprimento e 1,5-2 µm de largura, podendo em sua célula ser diferenciado o citoplasma e o cinetoplasto (SUNDAR; RAI, 2002), é desprovida de motilidade, apresentando apenas um flagelo rudimentar, que não é visível por microscopia óptica convencional. As formas amastigotas estão geralmente localizadas nas células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) como macrófagos, monócitos, células de Langerhans, células de Kupffer e células apresentadoras de antígenos (ROZE, 2005).

A taxonomia do gênero *Leishmania* tem suscitado a proposição de diferentes classificações desde o início do conhecimento sobre estes parasitos. Hoje se aceita a divisão do gênero em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, com base nas diferenças existentes durante o desenvolvimento das promastigotas dentro do inseto vetor (BANETH, 2006).

As formas tegumentares no Brasil são determinadas por sete espécies, seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (Leishmania) amazonensis* (LAINSON; SHAW, 1987; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

A forma visceral é causada por espécies pertencentes ao complexo “*Leishmania donovani*” (LAINSON; SHAW, 1987) que está representado nas Américas pelas espécies *L. (Leishmania) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*. Esta última, devido ao desenvolvimento de técnicas moleculares e a constatação de que essa espécie é bioquímica e antigenicamente indistinguível de *L. (L.) infantum*, a tendência é considerá-las como sendo o mesmo organismo (MAURÍCIO et al., 2001). Sendo assim, desse ponto em diante neste trabalho, será referido como agente da LV a espécie *Leishmania (L.) infantum chagasi* [*L. (L.) infantum chagasi*]. Ao contrário do que ocorre com a *L. donovani*, na transmissão da *L. (L.)*

infantum chagasi, o homem é uma fraca fonte de infecção para os flebotomíneos e a transmissão depende principalmente de cães infectados (LAINSON; SHAW, 1987; SHAW, 2006).

2.4 Vetor

Os vetores da leishmaniose visceral são dípteros pertencentes à família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, denominados flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros. São pequenos, medindo 1 a 3 mm de comprimento, possuem o corpo revestido de pelos e são de coloração clara. São facilmente reconhecíveis pelo seu comportamento, ao voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas. Na fase adulta estão adaptados a diversos tipos de ambientes. Na fase larvária desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos e ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa e não na água, o que dificulta o seu controle (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). Ambos o sexos precisam de carboidratos como fonte energética e as fêmeas se alimentam também de sangue para o desenvolvimento dos ovos (BRASIL, 2006).

Segundo Galati (2003), existem 470 espécies de flebotomíneos descritas, destas, 10% podem atuar na transmissão das leishmanioses. Para Chappuis et al. (2007), 30 diferentes espécies de flebotomíneos podem transmitir o agente ao homem, dos quais somente as fêmeas são capazes de inocular a forma promastigota na pele (DESJEUX, 2004), destacando-se os gêneros *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* na África, Europa e Ásia (KILLICK-KENDRICK, 1990).

A espécie *Lutzomyia longipalpis* tem sido considerada o principal vetor da *L. (L.) infantum chagasi* nas Américas, embora já tenham sido incriminadas como vetoras outras espécies de *Lutzomyia* como a *Lu. evansi* e *Lu. cruzi* (TRAVIS et al., 1996; GALATI et al., 1997).

No Brasil, duas espécies estão relacionadas com a transmissão do agente etiológico da LV, *Lu. longipalpis*, principal espécie transmissora no país e *Lu. cruzi*, encontrada infectada naturalmente e incriminada como vetora no estado de Mato Grosso do Sul (SANTOS; ARIAS; RIBEIRO, 1998; GALATI et al., 1997).

Nos países de clima temperado, os flebotomíneos encontram-se mais ativos durante os meses quentes do ano. Na América do Sul, esta atividade perdura todo o ano sendo intensificada em ocasiões de ausência de vento e chuva, alta umidade e temperaturas entre 15 e 28°C. Após a estação chuvosa a densidade populacional do vetor aumenta. As fêmeas

adultas alimentam-se principalmente durante o período crepuscular e noturno e são atraídas às residências pelo fototropismo positivo (KILLICK-KENDRICK, 1990; BARATA et al., 2005; SHARMA; SINGH, 2008). *Lutzomyia longipalpis* adapta-se facilmente ao peridomicílio e a variadas temperaturas podendo ser encontrada no ambiente intra e peridomiciliar como galinheiros, pocilgas, canis, paiol entre outros (BRASIL, 2006). Assim, é de essencial importância conhecer a flutuação sazonal da fauna de flebotomíneos em uma região, para que seja possível planejar medidas antivetoriais efetivas (OLIVEIRA et al., 2006).

Neste contexto, pesquisas referentes à fauna flebotomínica realizada em Corumbá/MS identificaram a presença de oito espécies, sendo as mais frequentes *Lu. cruzi*, seguida de *Lu. forattinii* e *Evandromyia corumbaensis*, que foram encontradas tanto no peri quanto no intradomicílio de forma que as duas primeiras apresentaram elevada antropofilia e alta densidade populacional, o que levou os autores a sugerirem a participação destas duas espécies na veiculação do parasito na área estudada (GALATI et al., 1997).

No município de Campo Grande no ano de 2000, o primeiro relato de *Lu. longipalpis* na área urbana do município foi descrito por Oliveira, Falcão e Brazil (2000), com o alerta para as autoridades locais quanto ao risco iminente de casos, tanto de LV canina quanto humana. Posteriormente, em novo estudo da fauna flebotomínica na cidade, Oliveira et al. (2003), assinalaram, além da presença de *Lu. longipalpis* a ocorrência em simpatria com *Lu. cruzi*. Desde então se tem verificado aumento significativo da densidade de *Lu. longipalpis*, sendo que a maioria dos espécimes foi capturada na região central da cidade, além de haver um incremento no número de casos de LV em cães e humanos, evidenciando a exposição humana ao vetor e a transmissão ativa da doença na cidade (OLIVEIRA A et al., 2006). Silva et al. (2008) relatam a presença de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos no município de Campo Grande, após estudo da fauna flebotomínica entre os anos de 2005 e 2006.

2.5 Ciclo biológico

Os ciclos de transmissão da LV dividem-se em: (i) ciclo urbano zoonótico e por vezes antroponótico, no qual os cães comportam-se como reservatórios e fontes de infecção para os flebotomíneos, e onde o homem ocasionalmente também pode comportar-se como reservatório; (ii) ciclo silvestre zoonótico, mantido entre animais silvestres (raposas e/ou gambás) e o flebotomíneo, eventualmente envolvendo o homem; e (iii) ciclo zoonótico rural e urbano, onde animais domésticos tornam-se infectados devido à proximidade com outros

animais do ciclo zoonótico silvestre que servem como fonte de infecção para o vetor, presente no peridomicílio (ASHFORD et al., 1998).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados com as formas amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas, que se diferenciam rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas que se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes – promastigotas metacíclicas (AWASTHI et al., 2004).

É necessário um período entre 8 a 20 dias após a ingestão de um repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado por protozoários do gênero *Leishmania*, para que o parasita evolua no tubo digestivo destes dípteros, ocasião em que estarão aptos a infectar outros vertebrados (BRASIL, 2000). Assim, através da picada, fêmeas de flebotomíneos inoculam as formas flageladas promastigotas metacíclicas, que no hospedeiro vertebrado transformam-se em formas amastigotas intracelulares (DEANE; DEANE, 1954; MURRAY et al., 2005).

As fêmeas de muitas espécies desse grupo tem hábitos antropofílicos, ou seja, têm afinidade ou preferência pelo sangue humano, pois necessitam exercer a hematofagia, para a maturação dos ovários e o desenvolvimento dos ovos. Durante a alimentação, os flebotomíneos introduzem no hospedeiro, através da saliva, um peptídeo que se considera um dos mais potentes vasodilatadores conhecidos (BRASIL, 2003).

As fêmeas infectantes ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado regurgitam formas promastigotas metacíclicas infectantes na pele do mamífero juntamente com a saliva. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se até o rompimento dos mesmos, destruindo a célula hospedeira. Assim, há liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, iniciando uma reação inflamatória e a disseminação hematogênica que será responsável pela dispersão do parasito para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (GENARO, 2003; BRASIL, 2006). Os macrófagos são as principais células hospedeiras para replicação do parasito e também as células efectoras para sua destruição. Portanto, as promastigotas interagem com os indivíduos infectados muito brevemente sem causar manifestações clínicas,

enquanto as amastigotas persistem em seus hospedeiros por anos ou por toda a vida, sendo responsáveis pelas manifestações da doença (CHAPPUIS et al., 2007).

2.6 Leishmaniose visceral canina (LVC)

Na área urbana, o cão (*Canis lupus familiaris*) é a principal fonte de infecção para a *L. (L.) infantum chagasi* sendo considerado o reservatório doméstico do protozoário. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem (GONTIJO; MELO, 2004).

Os cães domésticos possuem atributos necessários para serem reservatórios do agente da LV. São mais susceptíveis à doença, com prevalência elevada em áreas endêmicas, principalmente de assintomáticos; possuem um intenso parasitismo de pele, podem permanecer meses e até anos sem desenvolver a forma clínica da doença e residem próximo ou dentro das habitações humanas, favorecendo o ciclo da doença (DANTAS-TORRES, 2007).

Para Carmargo-Neves e Gomes (2002), na história natural da doença, principalmente em áreas urbanas, observa-se que o aumento de casos da infecção entre cães aumenta o risco da ocorrência da leishmaniose em humanos.

No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon hous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). No Brasil, as raposas foram encontradas infectadas nas regiões Nordeste, Sudeste, Amazônica e Centro Oeste (NUNES et al., 1988). Os marsupiais foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia (BRASIL, 2006), e os roedores são incriminados como potenciais reservatórios do parasito (CABRERA et al., 2003).

A participação de outras espécies animais como galinhas, ovinos, equídeos, caprinos, suínos e felinos na epidemiologia da LV parece estar associada à capacidade de atração dos vetores ao peridomicílio ou atuação daquelas espécies como reservatórios do parasito (MORAES-SILVA et al., 2006). Segundo Gramiccia (2011), felinos podem representar um reservatório secundário para *L. (L.) infantum chagasi*, e quanto aos equinos, as evidências existentes não podem comprová-lo como um reservatório.

A leishmaniose não acomete aves, entretanto galinhas são extremamente atrativas para os flebotomíneos, servindo como fonte alimentar e atraindo reservatórios como lobinhos e raposas. Em muitas regiões, a criação de galinhas pode ser um fator de risco para a presença do vetor e reservatórios de *L. (L.) infantum chagasi* (DANTAS-TORRES, 2006). Alexander

et al. (2002), concluíram que apesar das criações domésticas de galinhas (*Gallus gallus*) atraírem *Lu. longipalpis* e serem importantes para a manutenção do vetor no meio ambiente, não são importantes na manutenção da infecção.

De acordo com Silva; Andreotti; Honer (2007), na área urbana de Campo Grande existe o hábito de criar galinhas mais pela ligação rural de alguns habitantes do que como fonte de renda. Pode-se observar que na maioria dos casos de LV em humanos, existiam essas criações nas proximidades ou na residência do paciente.

Em pesquisa realizada por Barboza et al. (2006), em municípios da região metropolitana de Salvador (BA) foi constatado que a presença de suínos no peridomicílio representava um incremento de 7,7 vezes do risco de infecção dos cães pela *L. (L.) infantum chagasi*. Esse dado confirma a importância do suíno na atração e alimentação do vetor nas proximidades das habitações humanas, além de proporcionar condições ambientais (umidade e acúmulo de matéria orgânica no solo) para a criação do vetor no peridomicílio, favorecendo o desenvolvimento das fases larvais de *Lu. longipalpis*. Da mesma forma Moreira Júnior et al. (2004), verificaram que a presença de equinos e suínos pode aumentar o risco de infecção pela leishmaniose.

Por meio da análise e comparação do número de cães eutanasiados no município de Araçatuba/SP/ Brasil, e das taxas de leishmaniose humana naquele município entre 1999 e 2008, Nunes et al. (2010) concluíram que a redução da incidência humana da doença esteve estatisticamente relacionada à taxa de eutanásia quando esta foi analisada no período de dois anos após a aplicação da medida.

Sendo assim, os cães, considerados principais reservatórios fora do ambiente silvestre, são de grande importância na manutenção do ciclo da doença, em virtude destes animais apresentarem maior quantidade de parasitos na pele que o homem, fato que favorece a infecção dos vetores e sua transmissão para a população canina e humana. Do ponto de vista epidemiológico, a doença canina é considerada mais importante que a doença humana, pois além de ser mais prevalente, apresenta grande contingente de animais assintomáticos albergando parasitos na derme, com potencial de transmitir a doença (PALATNIK-DE-SOUZA et al., 2001).

Ocasionalmente pode ocorrer a transmissão da doença sem envolvimento do vetor artrópode, isto é, por meio de transfusão sanguínea, transplantes ou por via transplacentária (MOREIRA JÚNIOR et al., 2004). Em cães, já está provada a transmissão via transfusão, prática cada vez mais frequente na clínica veterinária, principalmente devido à falta de monitoramento de doadores. Além disso, muitos cães que receberam transfusão podem ser

assintomáticos e servirem como reservatórios, tendo a pele como fonte de infecção para flebotomíneos (FREITAS et al., 2006).

A leishmaniose canina é o protótipo de uma disfunção imunológica específica resultante do parasitismo do sistema mononuclear fagocitário pela leishmania, produzindo um amplo espectro de manifestações clínicas e imunológicas que pode ser categorizado em três formas distintas: na forma clínica assintomática não se observa presença de sinais clínicos sugestivos da doença, e os animais são aparentemente saudáveis e ativos, enquanto na forma clínica oligossintomática os animais podem apresentar sinais clínicos brandos, como por exemplo, perda moderada de peso, ulcerações cutâneas discretas que ocorrem frequentemente na ponta da orelha e em áreas periorbitais, alopecia localizada e algumas vezes, opacificação da pelagem (REIS et al., 2009). A forma clínica sintomática é caracterizada pela presença de mais de três sinais clínicos graves da leishmaniose que se manifestam no decorrer da doença, como ulcerações cutâneas geralmente crostosas, onicogribose, dermatite furfurácea, ceratoconjuntivite, opacificação das córneas, paresia dos membros posteriores, intensa perda de peso que às vezes evolui para anorexia e caquexia, podendo evoluir até um progressivo estado geral de prostração e óbito (MANCIANTI et al., 1988).

Apesar da grande variedade de sinais clínicos da leishmaniose, a doença canina pode permanecer clinicamente inaparente por longos períodos. Dependendo da fase da infecção, muitos cães infectados apresentam-se assintomáticos, mas mesmo assim são fontes de infecção para os flebotomíneos, e conseqüentemente tem papel ativo na transmissão da *Leishmania* (PALATNIK-DE-SOUZA et al., 2001). Apenas uma parcela dos cães infectados desenvolve a doença clínica, na dependência da competência imunológica desses animais (MORENO; ALVAR, 2002).

De acordo com Cardoso et al. (2007), os animais assintomáticos são a maioria na população canina infectada, representando relevante importância na epidemiologia da doença. Dessa forma, a avaliação dos animais assintomáticos é de fundamental importância em regiões endêmicas de leishmaniose, uma vez que estes não são identificados no exame clínico e algumas vezes, são indetectáveis pelos métodos sorológicos convencionais devido aos baixos títulos de anticorpos.

Estudos mostram que aproximadamente 94 dias após a infecção por *L. (L.) infantum chagasi*, o cão apresenta resultado sorológico positivo (QUINNELL et al., 1997) tornando-se fonte de infecção para o flebótomo 105 dias após a soroconversão. Sendo assim, o cão torna-se fonte de infecção aproximadamente seis meses após ter sido picado por fêmeas de flebotomíneos infectadas (COURTENAY et al., 2002).

É consenso entre vários autores que cães portadores da forma clínica assintomática, ou apresentando baixa carga parasitária são geralmente considerados mais resistentes à infecção. Por outro lado, animais sintomáticos que geralmente estão relacionados com elevados níveis de anticorpos e parasitismo tecidual, representam cães com maior susceptibilidade e, portanto, uma apresentação clínico-laboratorial mais grave da doença (REIS et al., 2006; ALVES et al., 2009).

Silva et al. (2005), ao estudarem cães de área endêmica, perceberam que animais com altos títulos sorológicos são potenciais fontes de infecção para flebotomíneos, pois, além do parasitismo disseminado nos órgãos, possuem alta carga parasitária na pele.

Quanto aos biomarcadores de progressão clínica na leishmaniose, Coura-Vital et al. (2011) afirmam que durante a infecção pelo protozoário, o organismo hospedeiro fica exposto a uma série de antígenos derivados do parasito, respondendo a estes por meio de mecanismos múltiplos de imunidade celular e humoral.

O estado clínico do cão está diretamente relacionado ao tipo de resposta imunológica celular protetora que controla a infecção, ou humoral, quando uma doença lenta e progressiva se desenvolve (FERRER, 1999). A presença da resposta humoral está associada à doença clínica, enquanto a resposta celular tem sido observada em animais assintomáticos (MORENO; ALVAR, 2002). Estes dois processos distintos dependem de fatores inerentes do parasito como a cepa e aqueles referentes ao hospedeiro vertebrado como a constituição genética, estado nutricional e imunitário e têm sido apontados como parâmetros importantes capazes de influenciar a evolução do quadro clínico da LVC (QUINNELL et al., 2003).

A resposta das células T do hospedeiro é decisiva para a evolução da infecção. A ativação da resposta celular Tipo 1 (Th1), está associada ao predomínio na síntese de IFN-gama, IL-2 e TNF- α , que tem demonstrado serem marcadores de resistência, estando presente em animais assintomáticos. Por outro lado, na resposta Tipo 2 (Th2), encontrada em animais sintomáticos, observa-se o predomínio na produção de IL-4 e IL-10 (BARBIERI, 2006).

Os níveis de isotipos de imunoglobinas (Ig) na infecção natural e experimental por *L. (L.) infantum chagasi* vêm sendo estudados por vários autores (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; QUINNELL et al., 2003; REIS et al., 2006). Esses trabalhos evidenciaram que títulos altos de anticorpos apresentam-se como um importante biomarcador para monitoramento do estado clínico e da densidade parasitária tecidual (REIS et al., 2006), geralmente acompanhando a piora do quadro clínico e o aumento da replicação de formas amastigotas em órgãos linfóides.

Assim, cães infectados apresentam níveis aumentados de anticorpos principalmente do tipo IgG, não correlacionados à proteção e sim à sintomatologia (COURTENAY et al., 2002; SILVA F., 2007). A gravidade e a variedade de sinais clínicos da doença dependem do equilíbrio entre as duas respostas e da virulência do parasito (FEITOSA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2011).

Os anticorpos específicos produzidos na resposta humoral são verificados até cinco meses após a infecção e seus níveis podem estar elevados antes da manifestação dos sinais clínicos (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2011).

Por ser o cão um importante hospedeiro e fonte de infecção para os vetores, esta espécie é um dos alvos na estratégia de controle da doença (GONTIJO; MELO, 2004), visto que serve como amplificador da infecção para os outros cães e humanos (WERNECK et al., 2002). Tal estratégia baseia-se na conjectura de que a incidência de infecção em humanos está diretamente relacionada ao número de cães infectantes e à capacidade da população de flebotomíneos transmitir infecção do cão para o homem. Nesse contexto, a presença de um grande número de pessoas não imunes, reservatórios infectados e vetores em abundância, configurariam as condições básicas para a ocorrência de casos autóctones da doença (COSTA; TAPETY; WERNECK, 2007).

As medidas de controle da leishmaniose estabelecidas por Deane (1956) baseiam-se em um tripé de ações que preconiza o tratamento de pessoas doentes, aspersões de inseticida no domicílio e peridomicílio e a eutanásia de cães soropositivos.

A medida de controle do reservatório canino acarreta profundo impacto, considerando a relação homem-cão na sociedade e tendo em vista que esses animais têm se transformado em verdadeiros “membros” da família, o sacrifício de cães com sorologia anti-*Leishmania* positiva, muitas vezes assintomáticos, torna-se cada vez mais inaceitável e de difícil execução pelas autoridades de saúde pública. Entretanto, alguns autores mostram que a remoção de cães soropositivos reduz a incidência de LV humana e canina (ASHFORD et al., 1998, NUNES et al., 2010), outros, porém, não concordam (COSTA et al., 2001; LEMOS et al., 2008).

A descoberta de vacinas para humanos e cães seria a mais eficiente medida de controle para a LV (DYE, 1996), de forma que a utilização de uma vacina eficaz para a doença canina poderá ter um impacto na redução da prevalência da infecção canina e, conseqüentemente, da humana (MARZOCHI et al., 1981; HOMMEL et al., 1995).

Os laboratórios Fort Dodge Saúde Animal e Hertape Calier Saúde Animal estão comercializando, no Brasil, as vacinas contra leishmaniose visceral canina, Leishmune[®] e Leish-Tec[®], respectivamente desde os anos de 2003 e 2006, devidamente registradas no

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Já tiveram os ensaios em animais de laboratório (testes pré-clínicos) e estudos de fase I e II completados, o que permitiu os seus registros no MAPA, pois atendiam aos critérios estabelecidos na legislação vigente à época (BRASIL, 2009b).

Contudo, no ano de 2007, o desenvolvimento de vacinas anti-leishmaniose visceral canina foi normatizado pelo Ministério da Saúde, normas essas que contemplam a realização de testes para determinar a segurança, a eficácia, a inocuidade, a proteção à infecção e imunogenicidade das vacinas, conduzidos por meio de ensaios de fase I, fase II e fase III e ainda, que as empresas que já possuíam registro de vacinas dispunham de um prazo de 36 meses a partir de 09 de julho de 2007, para realizarem e apresentarem ao órgão competente os estudos da fase III, para fins de renovação e manutenção do registro. Tais estudos ainda não foram concluídos (BRASIL, 2009b). Além disso, a utilização destas vacinas criou um problema específico para levantamentos soropidemiológicos e por consequência nas campanhas de controle, já que os testes sorológicos baseiam-se na detecção de IgG total, ficando impossível distinguir animais infectados de vacinados. Devido a essa problemática, muitos estudos estão sendo conduzidos para o desenvolvimento de um teste sorológico específico e discriminatório de subclasses de IgG, que poderia fornecer informações sobre a imunopatogênese natural do hospedeiro (humano e canino) (OLIVEIRA C. et al., 2008).

Frente a esta problemática, o Ministério da Saúde determinou em nota técnica a proibição do uso da vacina até que sejam concluídos e apresentados os estudos de Fase III requeridos pelo órgão competente, e que os animais soroconvertidos em virtude deste uso, são passíveis de eutanásia, conforme o programa de controle da doença (BRASIL, 2009b).

Cabe salientar que, em informe do Laboratório fabricante da vacina Leishmune[®], após breve explanação sobre o teste ELISA usado no momento do registro e os *kits* usados na rotina do diagnóstico da LVC no Brasil, conclui que os animais vacinados não devem manifestar sorologia positiva para a doença, por não possuírem antígenos que possam ser reconhecidos pelos anticorpos anti-FML, presentes nos animais vacinados (FORT DODGE, 2012).

Para Solano-Gallego et al. (2011), a prevenção deve ser uma abordagem integrada, incluindo a vacinação contra a *L. (L.) infantum chagasi* com uma vacina canina eficaz e da aplicação de um inseticida tópico a ser aplicado no cão com efeito de repelência ao flebótomo.

Os procedimentos integrados preconizados pelo Ministério da Saúde para o controle e prevenção da infecção pela leishmaniose visceral, tanto para humanos quanto para os cães,

são: a eutanásia sistemática dos animais sabidamente positivos, medidas de manejo e higiene ambiental, avaliação e diminuição da população do vetor com a utilização de inseticida no intra e peridomicílio, tratamento adequado para as pessoas doentes e ações de educação continuada à população. Além disso, o programa de controle da leishmaniose visceral (PCLV) busca uma melhor definição das áreas de transmissão e/ou risco e propõe ações de vigilância para os municípios considerados silenciosos (BRASIL, 2006, BRASIL, 2009a).

De acordo com Dye (1996), o que sustenta a utilização do controle vetorial e dos reservatórios como estratégias de intervenção sobre a LV é a conjectura de que a incidência de infecção em humanos está diretamente relacionada ao número de cães infectantes e à capacidade da população de flebotomíneos em transmitir a infecção do cão para o homem.

Estudos enfocando a estratégia de eliminação canina têm oferecido resultados conflitantes, ao menos quando ela é adotada separadamente do controle vetorial (DIETZE et al., 1997; ASHFORD et al., 1998; PALATNIK-DE-SOUZA et al., 2001). Por sua vez, experiências têm demonstrado a efetividade do controle vetorial em diversas situações, como é o caso do estudo realizado em Porteirinha, norte de Minas Gerais, que identificou uma redução na incidência da leishmaniose canina e humana, após a retirada sistemática de cães soropositivos, no mesmo momento em que o controle vetorial também foi implementado (FRANÇA-SILVA et al., 2003).

Segundo Werneck et al. (2002), são poucos os estudos brasileiros delineados para avaliar, conjuntamente, a efetividade do controle vetorial e da eliminação canina na redução da incidência de infecção humana. Entretanto, em estudo posterior realizado pelos mesmos autores na cidade de Teresina, no Piauí avaliando a efetividade das estratégias de controle da LVC, concluíram que os resultados apontaram para um efeito protetor da eliminação de cães infectados na incidência da infecção pela *L. (L.) infantum chagasi* adicionalmente ao potencial efeito protetor propiciado pela borrifação intradomiciliar. Entretanto, a borrifação extradomiciliar, associada ou não à eliminação canina não adicionou efeito protetor significativo. Os autores ainda concluíram que o efeito protetor da eliminação de cães infectados encontra fundamento no conhecimento atual sobre a transmissão desta infecção, na qual a remoção de cães infectados estaria reduzindo o *pool* de fontes de infecção para flebotomíneos, limitando a capacidade desses vetores em transmitir o parasito para os humanos (COSTA; TAPETY; WERNECK, 2007).

Outras medidas auxiliares de controle vêm sendo intensificadas, como a utilização de coleiras impregnadas com inseticida para repelir o vetor (REITHINGER, 2004; GAVGANI et al., 2002), o desenvolvimento de estudos avançados em relação a vacinas para prevenção da

doença e a intensificação de pesquisas e trabalhos científicos inerentes à enfermidade (COSTA et al., 2001; MORENO; ALVAR, 2002).

Quanto à utilização da coleira impregnada com o inseticida, cita-se o trabalho realizado por Camargo-Neves, Rodas e Pauliquévis (2004) no município de Andradina (SP), onde os cães foram encoleirados pelo período de dois anos, com a troca da coleira a cada seis meses, obtendo com esta medida excelentes resultados. A utilização da coleira impregnada com deltametrina a 4% provoca o efeito de repelência, limitando o repasto sanguíneo e o número de fêmeas no ambiente, o que permitiu a redução da força da infecção entre os cães, que se expressou na diminuição da taxa de incidência da LV, comprovando o uso da coleira como efeito protetor para a comunidade. Tal medida pode ser adotada em larga escala em conjunto com os programas oficiais de controle da LV, em especial em municípios endêmicos, visando à redução da incidência em humanos e na população canina, e, principalmente, os custos do programa.

Em um estudo de coorte conduzido no município de Campo Grande/MS, envolvendo dois grupos de cães, um que não recebeu a coleira e outro (14.149 cães) que recebeu a coleira impregnada com deltametrina a 4% de forma contínua e trocada a cada seis meses durante dois anos, revelou menor soroconversão ($p < 0,0001$) naquele grupo que usou ininterruptamente a coleira, demonstrando a eficiência da mesma na prevenção de novos casos de LVC (BRAZUNA, 2012).

2.7 Diagnóstico da leishmaniose visceral canina

O diagnóstico, tanto em humanos quanto nos animais é baseado em sinais clínicos, nos dados epidemiológicos (ocorrência ou não da enfermidade na área do indivíduo ou animal) e o diagnóstico laboratorial (BRASIL, 2006).

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral canina ainda representa um desafio apesar dos progressos realizados no desenvolvimento de vários métodos diretos e indiretos. Um teste de diagnóstico eficaz, além de ser capaz de confirmar uma suspeita clínica em um único paciente, deve detectar a infecção em cães assintomáticos, ter alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, deve ser simples, de fácil execução, de baixo custo, viável em laboratórios regionais ou adaptáveis para condições de campo. Idealmente, ele deve detectar todos os cães infectados por *Leishmania*, utilizando preferencialmente, métodos de coleta de amostras biológicas não invasivos (MAIA; CAMPINO, 2008).

A leishmaniose visceral canina é caracterizada por uma marcada estimulação policlonal de linfócitos B, o que resulta na grande produção de imunoglobulinas. Sendo assim, a detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* por meio dos métodos sorológicos tem seu uso facilitado por serem menos invasivos e mais práticos (GONTIJO; MELO, 2004).

Segundo Courtenay et al. (2002), para o melhor controle da LV é necessário o emprego de testes diagnósticos com maior acurácia, que sejam capazes de identificar todos os animais que são fonte de infecção para o vetor, particularmente aqueles que se encontram entre o período de infecção e o início da infecciosidade, reduzindo efetivamente a transmissão do parasito pelos flebotomíneos.

O diagnóstico definitivo da leishmaniose detém dificuldades, uma vez que a sintomatologia pode ser polimórfica e semelhante a outras doenças. A resposta imunológica do hospedeiro, a espécie do parasito envolvida e a complexa relação parasito-hospedeiro são responsáveis pela produção dessas variações que dificultam o diagnóstico clínico, ainda que o quadro clínico esteja bem descrito e presente em geral, na fase crônica da doença (SANTOS-GOMES; FONSECA, 2008).

De acordo com o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde (BRASIL, 2003), o diagnóstico da LVC constitui um problema para os serviços públicos de saúde, principalmente devido a três fatores: a variedade de sinais clínicos; a inespecificidade das alterações histopatológicas e a inexistência de um teste diagnóstico sorológico 100% específico e sensível. A imprecisão dos métodos sorológicos, que no caso da imunofluorescência indireta (IFI), se expressa por valores de sensibilidade que variam de 90-100% e especificidade de 80%, para amostras de soro (ALVES; BEVILACQUA, 2004), tem sido uma das razões alegadas por médicos veterinários e proprietários de cães para contestarem a eutanásia dos cães soropositivos.

De acordo com Gontijo e Melo (2004), diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico da LV humana e canina, sendo que muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas a despeito do grande número de testes disponíveis para o diagnóstico da LV, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade. Quanto aos métodos disponíveis para o diagnóstico, esses não apresentam a eficácia e aplicabilidade desejadas, embora avanços promissores tenham sido alcançados com as pesquisas de novas técnicas de diagnóstico. Esse desempenho limitado dos testes diagnósticos é muitas vezes devido ao antígeno empregado na técnica.

Segundo Dourado et al. (2007), métodos de diagnóstico precisos para LV (elevadas sensibilidade e especificidade), de fácil realização e interpretação, que forneçam resultados

rápidos, que independam de infraestrutura laboratorial e de profissionais especializados, têm sido cada vez mais desejados. Ressaltam, no entanto, que a sensibilidade e a especificidade de qualquer técnica diagnóstica são passíveis de alterações durante o curso de uma infecção.

O diagnóstico laboratorial das leishmanioses pode ser realizado por métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares. Para determinar o exame laboratorial mais adequado é importante que se conheça a área provável de transmissão, o método a ser utilizado, as suas limitações e a sua interpretação clínica (BRASIL, 2006). Fatores importantes devem ser considerados na escolha do teste sorológico para LVC, como a evolução do quadro clínico dos cães infectados, os antígenos e a subclasse da imunoglobulina a ser utilizada na realização do teste (ALBUQUERQUE et al., 2007). De maneira geral, são utilizados parasitos totais ou lisados, o que interfere na especificidade do teste (ROSARIO et al., 2005).

A IFI consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com os parasitos, sob forma promastigota (*Leishmania* sp.), fixados em lâminas de microscopia. Em uma etapa subsequente, é utilizado um conjugado de anti-imunoglobulina de cão, fração IgG, marcada com produto fluorescente (isotiocianato de fluoresceína) para evidenciação da reação (BIOMANGUINHOS, 2008a).

O ensaio Imunoenzimático (ELISA) consiste na reação de soros com antígenos solúveis e purificados de leishmania obtidos a partir de culturas *in vitro*, adsorvidos nas cavidades de microplacas. Na etapa seguinte, adiciona-se uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos, caso estejam presentes. Para a evidenciação da reação utiliza-se tetrametilbenzina-TMB, formando um composto de coloração azul (BIOMANGUINHOS, 2008b). É um teste rápido, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a IFI (GONTIJO; MELO, 2004), e ainda possui maior reprodutibilidade (MANCIANTI et al., 1995). A especificidade do ELISA depende do antígeno utilizado (SUNDAR; RAI, 2002), podendo este ser originado de culturas de promastigotas ou proteínas recombinantes (BADARÓ et al., 1998). Nesse sentido, antígenos brutos de promastigotas ou seus antígenos solúveis limitam a padronização dos testes e reprodutibilidade dos resultados (HOMMEL et al., 1978), enquanto que antígenos recombinantes específicos do parasito vêm mostrando elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da LVC (SCALONE et al., 2002).

Segundo Mettler et al. (2005), o ELISA tem sido capaz de detectar animais sororreagentes tanto naqueles com e sem sinais clínicos, enquanto a IFI detecta maior parcela de animais com manifestações clínicas aparentes. Parte das dificuldades diz respeito à

sensibilidade e especificidade dos atuais testes sorológicos utilizados na rotina laboratorial (IFI e ELISA) para caracterizar infecção e doença. A sensibilidade desses testes é bastante discutível, não havendo concordância entre testes parasitológicos, imunohistológicos e os sorológicos. Atribui-se essa discordância à incapacidade dos testes sorológicos detectarem anticorpos nas várias fases da doença. Tal fato apresenta sérias consequências, pois implica na morte de animais (CABRERA et al., 2003).

De acordo com Santos-Gomes e Fonseca (2008) o ELISA apresenta sensibilidade e especificidade acima de 90%, porém, a inconveniência de detectar falsos positivos, por reações cruzadas com outros tripanossomatídeos. Segundo Dourado et al. (2007), áreas onde o *Trypanosoma cruzi* está presente, como no Mato Grosso do Sul (SOUZA et al., 2009), há possibilidade de reatividade sorológica cruzada em muitos testes diagnósticos, porém esta reatividade pode ser superada, utilizando-se um teste ELISA com proteína específica isolada da fase amastigota da *Leishmania* (rk39) ou de frações ligantes (fucose-manose ligantes).

Uma das estratégias de controle da doença do programa brasileiro de vigilância e controle da leishmaniose visceral (PCLV) é o controle de reservatórios domésticos por meio da eutanásia de animais infectados, sendo o diagnóstico laboratorial sorológico uma importante ferramenta para a identificação destes animais. Os métodos recomendados atualmente nos inquéritos caninos são o ELISA como triagem dos cães suspeitos e a IFI como teste confirmatório, sendo considerados positivos os soros reagentes nas diluições iguais ou superiores a 1:40. O material recomendado para o diagnóstico sorológico de LVC é o soro sanguíneo (BRASIL, 2006). Os kits diagnósticos ELISA-Bio-Manguinhos e IFI-Bio-Manguinhos foram comparados por Lira et al. (2006) que encontraram sensibilidade de 72 e 68%, respectivamente, e 92% quando usados em paralelo. Entretanto, apenas 48% quando usados consecutivamente.

De acordo com Laurenti (2010), os kits utilizados pelo Ministério da Saúde e fornecidos por Bio-Manguinhos para a realização do ELISA e IFI empregam formas promastigotas de *Leishmania major-like* (espécie que causa leishmaniose cutânea) como antígenos, e desta forma, acabam produzindo resultados falso-positivos e negativos. Porém, em pesquisa realizada por Barbosa-de-Deus et al. (2002), concluiu-se que o antígeno obtido de *L. major-like* mostrou 100% de especificidade e 92% de sensibilidade para diagnosticar a LV humana e canina, sem reações cruzadas com várias doenças, incluindo leishmaniose tegumentar. Por outro lado, estudo realizado por Baleeiro et al. (2006) demonstrou que a variação na espécie de *Leishmania* para a preparação do antígeno pode influenciar significativamente o resultado do ELISA, e que a utilização de antígenos preparados a partir

de *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis*, em vez de *Leishmania chagasi* resultou na diminuição de reatividade com soro de cães, podendo refletir na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em humanos.

Baseando-se na elevada homologia genética das espécies de *Leishmania* e alta reatividade cruzada, acredita-se que há motivos mais que suficientes para empregar diferentes espécies de *Leishmania* no diagnóstico da LV tanto para humanos como para cães (BARBOSA-DE-DEUS et al., 2002; LIRA et al., 2006). Rajasekariah et al. (2008) desenvolveram ELISA para o diagnóstico da LVC com *pool* de exoantígenos a partir de três espécies de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. donovani* e *L. major*). Os resultados mostraram correlação de 100% com a sintomatologia clínica.

Pesquisa realizada por Machado et al. (2007), com objetivo de comparar a concordância dos resultados dos testes de ELISA e IFI realizados por laboratórios de Belo Horizonte/MG utilizando antígeno de *Leishmania major* e de *Leishmania amazonensis*, mostrou resultados de concordância ótima a perfeita entre eles, o que indica que a qualidade diagnóstica está sendo mantida, corroborando a adoção de medidas estabelecidas pelo PCLV do Ministério da Saúde, referentes principalmente à identificação do reservatório canino.

Corroborando com tais achados, a afirmação de que a melhor forma de aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico é a realização combinada dos dois testes (ELISA e IFI), em vez de realizar apenas IFI (ALVES; BEVILACQUA, 2004). Caso ocorra discordância entre os resultados dessas metodologias, o mais indicado é considerar o quadro clínico do animal e repetir o exame após um mês, podendo ser realizado o exame parasitológico e/ou PCR. Entretanto, resultados negativos nestas metodologias não devem ser usados como confirmatórios (ALVAR et al., 2004; BANETH; AROCH, 2008).

De uma forma geral, a utilização da sorologia pode ser questionável, uma vez que animais saudáveis podem ser soropositivos e animais infectados ocasionalmente se tornam soronegativos, dificultando o uso destas técnicas. A sorologia mostra que animais infectados desenvolvem resposta específica de anticorpos, e a proporção de soroconversão entre animais com infecção clínica ou subclínica é desconhecida (CABRAL, 2007). Segundo Ferrer (2002), animais doentes desenvolvem principalmente resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania*; a soroconversão ocorre aproximadamente três meses após a infecção e os títulos permanecem elevados por pelo menos dois anos. Contudo, a permanência de animais falso negativos no ambiente epidêmico pode comprometer a eficácia do programa de controle da LV, contribuindo para a manutenção de focos da doença, e conseqüentemente, tornando-se fontes de infecção para pessoas e outros cães (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

De acordo com Coura-Vital et al. (2011), os métodos diagnósticos utilizados em áreas endêmicas subestimam o número de cães infectados, reforçando a hipótese de que um número considerável de cães positivos não é detectado nos inquéritos sorológicos e permanecem como reservatórios, possivelmente interferindo no controle da LV em ambiente urbano.

O diagnóstico laboratorial clássico é o parasitológico e depende da demonstração das formas promastigotas dos parasitos em cultura, ou de formas amastigotas de *Leishmania* em esfregaços de aspirado de linfonodo, medula óssea, baço e de fígado corados com Giemsa, Leishman ou Panótico® (DISH et al., 2003; LAURENTI, 2009). Os esfregaços de sangue podem ser examinados, mas apenas ocasionalmente são encontradas formas amastigotas de *Leishmania* em mononucleares (BONATES, 2003), não constituindo em exame de eleição para o diagnóstico.

De acordo com Romero e Boelaert (2010), as técnicas parasitológicas são altamente específicas, mas sua sensibilidade varia de acordo com o tipo de tecido e, além disso, requerem experiência laboratorial.

O método parasitológico apresenta 100% de especificidade (GONTIJO; MELO, 2004; BRASIL, 2006) baixa sensibilidade (BRAGA et al., 1998; FERRER, 1999; ASHFORD, 2000), variando de 52% a 98%, sendo a sensibilidade mais alta alcançada quando se utiliza aspirado do baço (DISH et al., 2003). Barrouin-Melo et al. (2006), utilizando esta técnica, identificaram amastigotas de *Leishmania* em 83% de 180 cães soropositivos e 23% de 26 soronegativos. É importante ressaltar que esses métodos apresentam limitações, tanto pela sensibilidade, tendo em vista a variação na intensidade do parasitismo, como por dificuldades técnicas ou operacionais que possam interferir na obtenção do material, não sendo qualificados para uso em inquéritos caninos (GONTIJO; MELO, 2004; LEAL, 2009).

Outra ferramenta muito útil no diagnóstico da leishmaniose visceral canina é o método molecular, por sua sensibilidade e especificidade, podendo ser aplicado diretamente sobre amostras clínicas e produzir resultado confiável em apenas algumas horas. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica que vem sendo utilizada com frequência no diagnóstico e monitoramento das leishmanioses. É capaz de detectar quantidades mínimas de DNA de *Leishmania* sp. em ampla variedade de amostras clínicas do homem, do cão, de reservatórios silvestres e de vetores. Esse método, considerado sensível e específico, baseia-se na amplificação *in vitro* de sequências de nucleotídeos presentes no parasito e pode ser realizado a partir de qualquer amostra biológica, principalmente em aspirados de medula óssea e de linfonodos (onde foram encontradas maiores concentrações de parasitos), biopsias de pele e também amostras de sangue periférico (GOMES et al., 2008).

A PCR tem apresentado maior sensibilidade quando comparada a métodos parasitológicos ou até mesmo sorológicos clássicos, sem necessidade de isolamento do parasito em cultura. A maioria dos estudos mostra que o método apresenta elevada sensibilidade (acima de 90%) e especificidade diagnóstica de até 100% (DISH et al., 2003). Comparando testes diagnósticos em um grupo de cães naturalmente infectados, Assis et al. (2010), concluíram que a PCR foi o método mais sensível e preciso no diagnóstico da LVC, confirmando o resultado positivo pelas outras técnicas e detectando DNA do parasito nos tecidos de 100% dos negativos. Os dados de Moreira et al. (2007), também corroboram estes resultados. Por outro lado, Sasaki et al. (2011), encontraram melhor resultado diagnóstico em animais infectados utilizando a IFI, seguido da PCR de aspirado de linfonodo.

A PCR detém a vantagem de poder ser utilizada em estudos epidemiológicos com cães assintomáticos em áreas endêmicas (BRASIL, 2003; GENARO, 2003). Porém, não se sabe se os cães soronegativos e PCR positivos são imunologicamente resistentes ou ainda vão desenvolver a doença. No entanto, pode-se afirmar que tiveram contato com o parasito (COURA-VITAL et al., 2011). Quinnell, Courtenay e Shaw (2001) mostraram em um estudo longitudinal em animais naturalmente infectados, que a sensibilidade da PCR foi alta no início da infecção diminuindo posteriormente, e que a sensibilidade sorológica também variou com o tempo, sendo baixa no momento da infecção e aumentando com o desenvolvimento da doença, sugerindo que a sorologia, quando bem definida, pode ser um teste sensível para a maior parte do curso da infecção. Entretanto, Queiroz et al. (2010) concluíram que no grupo de animais assintomáticos os testes sorológicos não foram boas opções no diagnóstico da doença, sendo preferível o uso de métodos parasitológicos e da PCR antes da soroconversão.

Nunes et al. (2007) afirmaram que a qualidade das amostras clínicas pode influenciar os resultados de sensibilidade e especificidade observados na PCR. Coletas de sangue homogeneizadas incorretamente podem levar à formação de coágulos que vão influenciar na extração do DNA alvo. Além disso, o grau de parasitemia dos animais infectados é outro fator que pode conduzir à baixa sensibilidade da PCR em amostras de sangue, de forma que o sangue total de cães não constitui uma boa ferramenta para o diagnóstico de LVC.

Apesar desses testes serem mais modernos e possuírem maior sensibilidade e especificidade do que IFI e ELISA, a maioria das técnicas são complexas, trabalhosas e onerosas, necessitam de laboratório bem equipado e de pessoal qualificado para sua realização, de forma que são aplicáveis somente para fins de pesquisa, não estando disponíveis para a rotina clínica veterinária, precisando ainda de muitos ajustes para torná-las mais simples e com custo operacional acessível (IKONOMOPOULOS et al., 2003;

GONTIJO; MELO, 2004), visto que possuem limitações para uso em larga escala e pouca adaptabilidade a campo (ASSIS et al., 2010).

Segundo Solano-Gallego et al. (2001), a aplicação da PCR em conjunto com a sorologia pode ajudar a determinar a extensão da infecção subclínica da LVC em áreas endêmicas, bem como estimar o número de cães que será alvo das medidas de controle, como observado na Europa. Reforçam ainda, sobre a grande importância da gestão de cães clinicamente saudáveis infectantes em áreas endêmicas; que a presença de DNA de *Leishmania* no sangue ou outros tecidos de cães clinicamente saudáveis que vivem em áreas endêmicas indica a presença de cães com a infecção, mas que eles podem nunca vir a desenvolver a doença clínica. Em contraste, um título de anticorpos altamente positivo pode indicar que um cão infectado está caminhando para o desenvolvimento de uma infecção generalizada e desenvolvimento futuro de uma doença clínica. Portanto, os autores recomendam o uso da sorologia isoladamente ou a combinação com a PCR para triagem de cães saudáveis, evitando a triagem de cães clinicamente saudáveis apenas pela PCR. Cães saudáveis devem ser rastreados para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* como uma indicação inicial para a presença da infecção.

Andrade et al. (2006) demonstraram em um estudo realizado em cães de Belo Horizonte (MG), que animais com diagnóstico sorológico e parasitológico negativos apresentavam-se positivos em métodos moleculares, caracterizando a leishmaniose assintomática causada por *L. infantum*. Esses resultados reforçam a hipótese de que os métodos diagnósticos utilizados em áreas endêmicas subestimam o número de cães infectados, não detectando na sorologia convencional (ELISA e IFI) um número considerável de cães positivos, que interferem no controle da doença.

Uma vantagem da PCR é a detecção do DNA do parasito antes da soroconversão, observando-se em área endêmica, alta prevalência de animais assintomáticos soronegativos apresentando resultados moleculares positivos (SOLANO-GALLEGO et al., 2001). No início da infecção, antes da soroconversão e/ou desenvolvimento de sintomas, a PCR mostra-se mais sensível que a sorologia; com a progressão da doença há uma elevação nos títulos de anticorpos e os testes sorológicos têm sua sensibilidade aumentada (QUINNELL et al., 2001). Estes fatos sugerem a necessidade de testes mais confiáveis, capazes de identificar a infecção em todas as fases da doença, ou o emprego de uma associação de métodos diagnósticos (COURA-VITAL et al., 2011).

Na última década, várias proteínas recombinantes foram desenvolvidas para realizar um diagnóstico preciso da LV, sendo a proteína recombinante K39 (rk39) a mais promissora

dessas moléculas. A rk39 é uma proteína recombinante constituída de uma sequência de 298 aminoácidos que se repetem 5,5 vezes, e tem peso molecular de 32,7 kDa. O antígeno usado em vários formatos do teste foi provado ser altamente sensível e específico para o diagnóstico da LV. É útil no diagnóstico da coinfeção de HIV-leishmaniose e como marcador de prognóstico (SINGH; SIVAKUMAR, 2003). O desenvolvimento do teste rápido baseado em antígenos rk39 revolucionou o diagnóstico da LV, oferecendo sensibilidade (faixa de 75 a 85%) e especificidade (70-92%) na detecção da doença no subcontinente Indiano (Índia e Nepal). Mais recentemente, abordando limitações dos resultados obtidos com a proteína k39, Pattabhi et al. (2010) compararam sua precisão diagnóstica com uma proteína de fusão denominada poliproteína recombinante k28 e os resultados indicaram grande potencial dessa última como ferramenta diagnóstica da leishmaniose visceral.

Trabalhos comparando ELISA que utilizam antígenos brutos e recombinantes (k39, k26 e A2) determinaram sensibilidades superiores para estes últimos, com sensibilidade próximo a 100% quando os testes foram usados em paralelo (PORROZZI et al., 2007; FALQUETO et al., 2009). Por outro lado, Rosario et al. (2005) não encontraram diferença entre o uso de antígenos brutos ou recombinantes nos ELISA, com soro ou eluato.

Métodos de diagnósticos mais precisos e que forneçam resultados mais rápidos e que independam de infraestrutura laboratorial são cada vez mais requisitados (DOURADO et al., 2007). Nesse sentido, o desenvolvimento dos testes rápidos imunocromatográficos utilizando o antígeno recombinante rk39 mostrou-se promissor no diagnóstico da doença humana apresentando excelentes resultados na Índia e Nepal (CHAPPUIS et al., 2007).

Na leishmaniose visceral (LV), a imunocromatografia que utiliza o antígeno recombinante rk39, conhecido comercialmente como TRALd (Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani*) tem sido bastante empregada pela fácil utilização a campo; além de tratar-se de um método sensível, específico e de rápida execução, vem apresentando bons resultados (LAURENTI, 2010). Ainda não há relatos que demonstrem a utilização desse teste no diagnóstico da LVC, mas acredita-se que seu emprego contribuiria de forma significativa, trazendo grandes avanços (COURA-VITAL et al., 2011).

O Kalazar Detect™ Rapid Test (Kalazar Detect® In Bios International Seattle, WA, USA) é um teste rápido imunocromatográfico empregado para a determinação qualitativa de anticorpos para o antígeno recombinante k39 de *L. (L.) infantum chagasi* em humanos (LEMOS et al., 2003).

O DiaMed IT-LEISH® , produzido pela DiaMed AG Cresiersur Morat, Suíça, e distribuído pela DiaMed Latino America S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil, é um teste

imunocromatográfico que permite a detecção rápida de anticorpos, também contra o antígeno recombinante k39 de *L. (L.) infantum chagasi* em humanos (SUNDAR; RAI, 2002). Em um estudo realizado entre 2005 e 2007, Assis et al. (2008), testaram 213 pacientes confirmados com LV e obtiveram 93% de sensibilidade, confirmando a validade do teste para uso no Brasil.

Dentre as novas tecnologias para o diagnóstico sorológico da LVC inclui-se o teste rápido *Dual Path Platform* (TR-DPP[®] - Leishmaniose Visceral Canina), patenteado pela Chembio Diagnostics e desenvolvido pelo Instituto Biomanguinhos/Fiocruz (FUNED, 2010). Trata-se de um ensaio imunocromatográfico de triagem que emprega de um lado, a combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal, e de outro, antígenos recombinantes rk28 (fusão da rk9, rk26 e rk39) específicos de *Leishmania* ligados a uma membrana de nitrocelulose. Se houver a presença de anticorpos anti-*Leishmania* na amostra testada, estes reagirão com os antígenos recombinantes, e em sequência se ligarão à combinação de proteína A e ouro coloidal, fornecendo o resultado positivo por meio de reação de cor. As vantagens são de um teste rápido, simples e de fácil uso, podendo ser executado a campo (BIO-MANGUINHOS, 2011; GRIMALDI et al., 2012).

Segundo Nota Técnica do Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis de dezembro de 2011, o teste rápido imunocromatográfico - TR-DPP[®]-Bio-Manguinhos passará a ser o teste de triagem nos inquéritos caninos e o ELISA, o teste confirmatório, com implantação gradual até o final de 2012 (BRASIL, 2011).

Em um recente trabalho com o TR-DPP[®], Grimaldi et al. (2012), encontraram sensibilidade de 98% no diagnóstico de cães sintomáticos e 47% nos assintomáticos, sugerindo a necessidade de testes mais sensíveis na detecção de animais recém infectados.

Diversos autores concordam que as principais desvantagens dos testes sorológicos são a falha em detectar cães infectados antes da soroconversão, a não diferenciação entre animais infectados e resistentes, e a suscetibilidade às reações cruzadas para com diversas outras enfermidades que acometem os cães como a tripanosomíase, babesiose, neosporose e erliquiose monocítica canina (EMC), correndo-se o risco de eutanasiar um cão falso-positivo (HARRUS, 2002; IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006; FEITOSA et al., 2006; LEAL, 2009; LUCIANO et al., 2009; LOPES et al., 2011; SILVA et al., 2011).

Das enfermidades incriminadas como possíveis causadoras de reações cruzadas, a EMC apresenta-se endêmica na maioria dos estados brasileiros, e apresenta alterações clínicas e hematológicas semelhantes às da leishmaniose visceral canina (GOMES; CORDEIRO, 2004; FEITOSA et al., 2006; OLIVEIRA T et al., 2008; VIEIRA et al., 2011).

2.8 Erliquiose

Erliquias são bactérias intracelulares obrigatórias, Gram-negativas, pertencentes à Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae, gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia*, que causam doenças no homem e animais (DUMLER et al., 2001). Dentre os membros da Família Anaplasmataceae inclui-se a *Ehrlichia canis*, principal espécie encontrada no Brasil (VIEIRA et al., 2011) causadora da erliquiose monocítica canina (EMC).

Ehrlichia canis infecta leucócitos e possivelmente plaquetas, se replica por fissão binária no interior das células hospedeiras, tendo como vetor o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* que tem distribuição mundial e abundante no Brasil (DUMLER et al., 2001; AGUIAR et al., 2007). Este vetor foi apontado também como sendo uma fonte variável de transmissão de *L. chagasi* para cães (COUTINHO et al., 2005).

A prevalência de *Ehrlichia canis* está amplamente associada à distribuição do vetor (VIEIRA et al., 2011). No Brasil, a erliquiose monocítica foi descrita pela primeira vez em Belo Horizonte em 1973 (COSTA, 1973) sendo que diferentes prevalências são perceptíveis nos estados do Nordeste e do Sul, relacionando-se a melhor adaptação e, conseqüentemente, ao maior número de carrapatos no clima quente e úmido do que em clima temperado. No entanto, altas prevalências são encontradas na região Centro-Oeste, sendo que a doença é considerada endêmica em áreas urbanas onde abundam populações do carrapato vetor (LABARTHE; CAMPOS PEREIRA; BARRARINI et al., 2003).

Os sinais clínicos mais frequentemente observados na fase aguda da doença são apatia, anorexia, palidez de mucosa, febre, sangramento nasal, linfadenopatia e esplenomegalia, podendo evoluir para a cura ou para as fases subclínica e crônica, esta última caracterizada pela produção prejudicada de elementos sanguíneos pela medula óssea, levando ao quadro de pancitopenia. O animal pode se curar ou entrar na fase subclínica, a qual pode persistir por anos, de forma que os sinais clínicos desaparecem, mas a bactéria se mantém no organismo (HARRUS, 2002; NEER; HARRUS, 2006; NAKAGHI et al., 2008).

A infecção por *Ehrlichia* spp. induz uma resposta humoral específica, base para diagnósticos sorológicos, podendo também ser diagnosticada por cultura em células, PCR e a detecção direta de mórulas no interior de mononucleares apenas na fase aguda da doença, mas mesmo assim, este último ainda é o método de diagnóstico de rotina para a erliquiose (MOREIRA et al., 2007; NAKAGHI et al., 2008; DA SILVA et al., 2010).

Dentre os testes sorológicos, a Imunofluorescência Indireta é utilizada no diagnóstico da erliquiose, sendo aplicável tanto para estudos de interesse experimentais quanto epidemiológicos. Os antígenos utilizados são procedentes do cultivo de células infectadas com *E. canis*, havendo detecção de anticorpos precoces em até sete dias pós-infecção, embora a maioria dos cães se tornam soropositivos após 28 dias da infecção (HARRUS, 1997). Para Aguiar et al. (2007), deve ser considerada a possibilidade do uso do teste sorológico como auxiliar no diagnóstico da erliquiose canina, desde que aliados ao histórico e ao exame clínico do cão.

Vários outros testes estão disponíveis para diagnosticar erliquiose, como o ELISA e a IFI. No entanto, uma maior precisão do diagnóstico tem sido reforçada pela introdução de culturas e técnicas moleculares. As culturas exigem instalações especializadas de laboratório e pessoal altamente treinado, enquanto a técnica de PCR é mais sensível e específica em comparação com os outros métodos. No diagnóstico utilizando-se técnicas sorológicas podem ocorrer resultados falso-positivos, porque essas técnicas não diferenciam infecção e exposição prévia ao organismo. No uso da PCR do sangue periférico podem ocorrer falso-negativos durante as formas subclínicas ou crônicas da doença, devido ao agente patológico estar dentro dos macrófagos (VIEIRA et al., 2011).

Em que pese a discussão entre alguns autores (GOMES; CORDEIRO, 2004; ROSARIO et al., 2005) que relatam a ocorrência de reação cruzada entre erliquiose e leishmaniose nos testes sorológicos, em estudos experimentais realizados por outros pesquisadores observou-se a não ocorrência de tal reação, mas apenas a coinfeção (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997; GOMES; CORDEIRO, 2004; OLIVEIRA T et al., 2008).

Há consenso entre os pesquisadores que há predomínio de cães com anemia normocítica e normocrômica, aumento das proteínas plasmáticas totais, e alterações na quantidade e função plaquetária, indicando alteração na hemostasia primária e na síntese e metabolismo dos fatores de coagulação, sinais estes que são mais evidentes nos cães sintomáticos devido ao comprometimento do sistema imunológico e pelo processo inflamatório, tanto na erliquiose quanto na leishmaniose canina (CIARAMELLA et al., 2005; SOUSA; ALMEIDA, 2008).

Sousa e Almeida (2008), pesquisando coinfeção entre erliquiose monocítica e leishmaniose visceral em cães de Cuiabá afirmaram que quando houve o encontro de mórulas de *Ehrlichia canis* em cães sororreagentes para leishmaniose, era evidente o agravamento do quadro clínico, fato comum em áreas endêmicas para ambas as doenças.

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram analisar a sensibilidade dos testes sorológicos (ELISA, IFI e TR-DPP[®]) isoladamente em amostras de cães assintomáticos com diagnóstico parasitológico positivo de leishmaniose visceral; realizar a comparação entre o protocolo de diagnóstico da LVC vigente, ELISA seguido da IFI e o proposto, TR-DPP[®] seguido do ELISA, como testes de triagem e confirmatório respectivamente. E ainda, analisar a possível interferência da infecção por *Ehrlichia canis* nos resultados do teste TR-DPP[®] para LVC.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z.; LABRUNA, M.B. Diagnóstico sorológico de ehrliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007.
- ALBUQUERQUE, A.R.; ARAGÃO, F.R.; FAUSTINO, M.A.G.; GOMES, Y.M.; LIRA, R.A.; NAKASAWA, M.; ALVES, L.C. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. **Revista Clínica Veterinária**, n. 71, p. 78-80, 2007.
- ALEXANDER, B.; CARVALHO, R.L.; McCALLUM, H.; PEREIRA, M.H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 1480-1485, 2002.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.
- ALVES, C.F.; DE AMORIM, I.F.; MOURA, E.P.; RIBEIRO, R.R.; MICHALICK, M.S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W.L.; TEIXEIRA, M.M.; MELO, M.N. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania chagasi)*. **Veterinary Immunology and Immunophatology**, v. 128, p. 349-359, 2009.
- ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.H. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, p. 259-265, 2004.
- ANDRADE, H.; REIS, A.B.; SANTOS, S.L.; VOLPINI, A.C.; MARQUES, M.J.; ROMANHA, A.J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 231-238, 2006.
- ANTONIALLI, S.A.C. Ecoepidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana e sua distribuição espacial no estado de Mato Grosso do Sul 1994 – 2003. **Tese (Doutorado)**. Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria do Estado de São Paulo, 2006, 150 p.
- ARRUDA, W.; COSTA, F.C.; NAAHAS, S.; ROSENFELD, G. Leishmaniose visceral. **Brasil-Médico**, v. 63, p. 64-65, 1949.
- ASHFORD, D.A.; DAVID, J.R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, M.C.; SAMPAIO, D.P.; BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 53-57, 1998.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonosis. **International Journal of Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.

- ASSIS, T.S.M.; BRAGA, A.S.C.; PEDRAS, M.J.; BARRAL, A.M.P.; SIQUEIRA, I.C.; COSTA, C.H.N.; COSTA, D.L.; HOLANDA, T.A.; SOARES, V.Y.R.; BIÁ, M.; CALDAS, A.J.M.; ROMERO, G.A.S.; RABELLO, A. Validação do teste imunocromatográfico IT-LEISH[®] para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana, **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17. n. 2, p. 107-116, 2008.
- ASSIS, J.; QUEIROZ, N.M.G.P.; SILVEIRA, R.C.; NUNES, C.M.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; JUNIOR, A.C.F.N.; NEVES, M.F.; MACHADO, R.Z.; BUZETTI, W.A.S. Estudo Comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2010.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian Journal Medicine Research**, v. 19, p. 238-258, 2004.
- BADARÓ, R.; DUARTE, M.I.S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESE, R.; FOCACCI, R. **Tratado de Infectologia**, São Paulo: Atheneu, v. 2, p.1234-1259, 1996.
- BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, M.C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J.M.; HOUGHTON, R.L.; DAVID, J.R.; REED, D.J. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of Infection Diseases**, n. 173, p. 758-761, 1998.
- BALEEIRO, C.O.; PARANHOS-SILVA, M.; DOS SANTOS, J.C.; OLIVEIRA, G.S.G.; NASCIMENTO, G.E.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; DOS SANTOS, W.L.C. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniasis endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 21-28, 2006.
- BANETH, G. Leishmaniasis. **Infectious diseases in dogs and cats**. In: GREENE, C.E. 3 ed. Philadelphia: Elsevier, p. 685-698, 2006.
- BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis a diagnostic and clinical challenge. **Veterinary Journal**, v. 175, p. 14-14, 2008.
- BARATA, R.A.; FRANÇA-SILVA, J.C.; MAYRINK, W.; DA SILVA, J.C.; LOROSA, A.P.E.S.; FIÚZA, J.A.; GONÇALVES, C.M.; DE PAULA, K.M.; DIAS, E.S. Aspects of the ecology and behaviour of phlebotomines in endemic area for visceral leishmaniasis in State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 421-425, 2005.
- BARBIERI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p. 329-37, 2006.
- BARBOZA, D.C.P.M.; GOMES NETO, C.M.B.; LEAL, D.C.; BITTENCOURT, D.V.V.; CARNEIRO, A.J.B.; SOUZA, B.M.P.S.; OLIVEIRA, L.S.; JULIÃO, F.S.; SOUZA, V.M.M.; FRANKE, C.R. Estudo de *coorte* em áreas de risco para leishmaniose visceral canina, em municípios da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n. 2, p. 152-163, 2006.
- BARBOSA-DE- DEUS, R.; DOS MARES-GUIA, M.; NUMES, A.Z.; COSTA, K.M.; JUNQUEIRA, R.G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; TAVARES, C.A. *Leishmania major*-

like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 6, p. 1361-1366, 2002.

BARROUIN-MELO, S.M.; LARANJEIRA, D.F.; ANDRADE FILHO, F.A.; TRIGO, J.; JULIÃO, F.S.; FRANKE, C.R.; AGUIAR, P.H.P.; DOS-SANTOS, W.L.C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Veterinary Journal**, v. 171, n. 2, p. 331-339, 2006.

BIO-MANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. IFI- Leishmaniose Visceral Canina. Imunoflorescência Indireta para diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **BIO-MANGUINHOS**, Rio de Janeiro, 2008a.

BIO-MANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. EIE- Leishmaniose Visceral Canina. Ensaio Imunoenzimático para diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **BIO-MANGUINHOS**, Rio de Janeiro, 2008b.

BIO-MANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. TR DPP[®] Leishmaniose Visceral Canina. Teste Rápido qualitativo para detecção de anticorpos de cão para *Leishmania*. **BIO-MANGUINHOS**, Rio de Janeiro, 2011.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Veterinary News**, ano 10, n. 61, p. 4-5, 2003.

BRAGA, M.D.M.; COELHO, I.C.B; POMPEU, M.M.L; EVANS, T.G.; MacAULLIFE, I.T.; TEIXEIRA, M.J.; LIMA, J.W.O. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, p. 419-24, 1998.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Centro Nacional de Epidemiologia. Doenças Infeciosas e Parasitárias: aspectos clínicos, vigilância epidemiológica e medidas de controle: **Guia de Bolso**, Brasília, 2 ed., 208 p., 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral**, Brasília. 1. ed., 120 p., 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral**, Brasília. 1. ed., 120 p., 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, Brasília, 7. ed., 2009a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE/MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Nota de esclarecimento sobre as Vacinas Antileishmaniose Visceral Canina registradas no MAPA**, 2009b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v. 2, n. 24, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Subcoordenação de Zoonoses Vetoriais e Raiva. Nota Técnica n. 48/2011-UVR/CGDT/DEVEP/SVS/MS. Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_48_2011_diagnostico_lvc_19_9_2011.pdf. Acesso em 25 set. 2011.

BRAZUNA, J.C.M. Estudos sobre leishmaniose visceral humana e canina no município de Campo Grande, MS, Brasil. **Tese** (Doutorado). Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012, 126 p.

CABRAL, A.W.D. Estudo comparativo entre o diagnóstico por técnicas sorológicas e da PCR para a detecção de *Leishmania* spp. **Dissertação** (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007, 56 p.

CABRERA, M.A.; PAULA, A.A.; CAMACHO, L.A.; MARZOCHI, M.C.; XAVIER, S.C.; DA SILVA, A.V.; JANSEN, A.M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 79-83, 2003.

CAMARGO-NEVES, V.L.F.; GOMES, A.C. Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35 (Supl III), p. 90-97, 2002.

CAMARGO-NEVES, V.L.F.; RODAS, L.A.C.; PAULIQUÉVIS, C.J.R. Avaliação da Efetividade da Utilização de Coleiras Impregnadas com Deltametrina a 4% para o Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: Resultados Preliminares. **Boletim Epidemiológico Paulista**, Ano 1, n. 12, 2004.

CAMPO GRANDE (Município). Prefeitura Municipal. Secretaria Municipal de Saúde Pública. Serviço de Vigilância Epidemiológica. **Relatório de notificações de leishmaniose visceral**, Campo Grande, 2006.

CAMPO GRANDE (Município). Prefeitura Municipal. Secretaria Municipal de Saúde Pública. Serviço de Vigilância Epidemiológica. **Relatório de notificações de leishmaniose visceral**, Campo Grande, 2010.

CARDOSO, L.; SCHALLIG, H.D.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; CABRAL, M.; ALUNDA, J.M.; RODRIGUES, M. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 117, p. 35-41, 2007.

CEVS – Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul. Nota Técnica do CEVS: Leishmaniose Visceral no Estado, 2009. Disponível em:

<http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=36334>. Acesso em 20 de fevereiro de 2012.

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, n. 11, p. 873-882, 2007.

CIARAMELLA, P.; PELAGALLI, A.; CORTESE, L.; PERO, M.E.; CORONA, M.; LOMBARDI, P.; AVALLONE, L. & PERSECHINO, A. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Journal**, n. 169, p. 465-467, 2005.

CORTADA, V.M.; DORVAL, M.E.; SOUZA LIMA, M.A.; OSHIRO, E.T.; MENESES, C.R.; ABREU-SILVA, A.L.; CUPOLILO, E.; SOUZA, C.S.; CARDOSO, F.O.; ZAVERUCHA DO VALLE, T. Canine visceral leishmaniasis in Anastacio, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Resume Communications**, v. 28, n. 5, p. 365-374, 2004.

COSTA, C.N.H.; VIEIRA, J.B.F.; GOMES, A.C.; COSTA, J.M.L.; LIMA, J.W.O.; DIETZE, R. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 223-228, 2001.

COSTA, C.H.N.; TAPETY, C.M.M.; WERNECK, G.L. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 415-419, 2007.

COSTA, J.O. *Ehrlichia canis* infection in dogs in Belo Horizonte – Brazil. **Arquivo da Escola Veterinária Universidade de Minas Gerais**, v. 25, p. 199-200, 1973.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M.J.; VELOSO, V.M.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; REIS, L.E.S.; BRAGA, S.L.; MORAES, M.H.F.; REIS, A.B.; CARNEIRO, M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n.8, 2011.

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. **The Journal of Infection Diseases**, n.186, p. 1314-20, 2002.

COUTINHO, M.T.Z.; BUENO, L.L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R.T.; BOTELHO, J.R.; MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n.1, p. 149-155, 2005.

DA 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 de Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 108-111, 2010.

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 3, p. 537-541, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Encontro de *leishmanias* nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. **Hospital de Rio de Janeiro**, v.45, p. 419-421, 1954.

DEANE, L.M. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. **Tese**. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 162 p., 1956.

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

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICKELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, p. 1240-1242, 1997.

DISH, J.; MACIEL, F.C.; OLIVEIRA, M.C.; ORSINI, M.; RABELLO, A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, p. 1-5, 2003.

DOURADO, Z.F.; SILVA, H.D.; SILVEIRA-LACERDA, E.P.; GARCÍA-ZAPATA, L.M.T.A. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 3, p. 205-214, 2007.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combination and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-65, 2001.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 2, p. 125-130, 1996.

FALQUETO, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.B.; PARROZZI, R.; COSTA, M.V.S.; TEVA, A.; CUPOLILLO, E.; CAMPO-NETO, A.; GRIMALDI, G.JR. 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, n. 4, p. 559-565, 2009.

FERRER, L. Clinical aspects of Canine Leishmaniasis. **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**, Barcelona, Spain, p. 6-10, 1999.

- FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. *In: Proceedings of Second International Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution*, Salamanca: Intervet Internacional, p. 21-24, 2002.
- FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba-SP (Brasil). *Clínica Veterinária*, n. 28, p. 36-44, 2000.
- FEITOSA, M.M.; ZANETTE, M.F.; IKEDA-GARCIA, F.A.; ROSSI, C.N.; HAGIWARA, M.K.; BRANDÃO, L.P. Reação cruzada entre erliquiose e babesiose com leishmaniose visceral canina pela técnica de ELISA. *In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA. Anais...* Vitória, Espírito Santo, junho, 2006.
- FORT DODGE LEISHMUNE – Vacina contra a Leishmaniose Visceral Canina. é Ética, é Legal e Protege. **Fort Dodge**. Disponível em: http://www.leishmune.com.br/leishmaniose/leishmune/.../14682_folheto.pdf. Acesso em 20 jan. 2012.
- FRANÇA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 111, n. 2-3, p. 161-173, 2003.
- FREITAS, E.; MELO, M.N.; COSTA-VAL, A.P.; MICHALICK, M.S.M. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potencial for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, v. 13, p. 159-167, 2006.
- FUNED. Fundação Ezequiel Dias. Funed valida teste mais rápido para leishmaniose visceral canina. **FUNED**, Minas Gerais, abr. 2010. Disponível em: <http://www.isaude.net/pt-BR/noticias/6636/geral/funed-valida-teste-mais-rapido-para-leishmaniose-visceral-canina.htm>. Acesso em 19 ago. 2011.
- GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.; REGO, J.R.F.A.; OSHIRO, E.T.; CHANG, M.R. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.
- GALATI, E.A.B. Classificação de Phlebotominae. *In: E.F. Rangel, R. Lainson, Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 53-126, 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.
- GENARO, O. Leishmaniose visceral. *In: NEVES, D.P.; MELO, A.I.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Parasitologia Humana*, 10 ed. São Paulo. Atheneu, p. 56-72, 2003.
- GOMES, A.P.S.; CORDEIRO, R.L.R. Reação cruzada no diagnóstico sorológico de leishmaniose canina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23, suplemento 1, p. 238, 2004.

- GOMES, Y.M.; PAIVA CAVALCANTI, M.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.; ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **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, n. 3, p. 338–349, 2004.
- GRAMICIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, v.181, p. 23-30, 2011.
- GRIMALDI, G; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.
- GRIMALDI, G.JR.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.B.; PINTO, I.S.; AZEVEDO, C.T.; FALQUETO, A. Evolution of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 54-59, 2012.
- HARRUS, S. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Veterinary Record**, v. 141, n. 10, p. 247-450, 1997.
- HARRUS, S. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v. 86, n. 4, p. 361-368, 2002.
- HOMMEL, M.; PETERS, W.; RANQUE, J.; QUILICI, M.; LANOTTE, G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Annals Tropical Medicine Parasitology**, v. 72, p. 213-218, 1978.
- HOMMEL, M.; JAFFE, C.L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 1, p. 55-73, 1995.
- IKEDA-GARCIA, F.A.; FEITOSA, M.M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, n. 62, p.32-38, 2006.
- IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOLIS, V.G. Diagnóstico molecular de leishmaniose em cães: aplicação comparativa dos métodos tradicionais de diagnóstico e no teste proposto em amostras clínicas. **Veterinary Parasitology**, n. 113, p. 99-113, 2003.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical Biochemistry of domestic animals. **Academic Press**, n. 5, p. 932, 1997.
- KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis. A review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, p. 1-24, 1990.

LABARTHE, N.; CAMPOS PEREIRA, M.; BARRARINI, O. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v. 4, n. 1, p. 67-75, 2003.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in biology and medicine**. Academic Press, v. 1, p. 1-120, 1987.

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

LAURENTI, M.D. Patologia e patogenia das leishmanioses. **Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo**, 140 p., 2010.

LEAL, C.R.B. Métodos disponíveis e possíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 69, p. 14-18, 2009.

LEMOS, E.M.; CARVALHO, S.F.G.; COREY, R.; DIETZE, R. Avaliação do teste rápido utilizando o antígeno recombinante k39 no diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, supl. 2, 2003.

LEMOS, E.M.; LAURENTI, M.D.; MOREIRA, M.A.; REIS, A.B.; GIUCHETTI, R.C.; RAYCHAUDHURI, S.; DIETZE, R. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. **Acta Tropical**, v. 107, p. 205-207, 2008.

LIRA, R.A.; CAVALCANTI, M.P.; NAKAZAMA, M.; FERREIRA, A.G.; SILVA, E.D. Canine visceral leishmaniasis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina- Biomanguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Biomanguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 11-16, 2006.

LOPES, M.G.; MENDONÇA I.L.; FORTES, K.P.; AMAKU, M.; PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M. Presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* in dogs from Piauí. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p.111-114, 2011.

LUCIANO, R.M.; LUCHESIS, S.B.; TRONCARELLI, M.Z.; LUCIANO, D.M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania spp* e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 46, n. 3, p.181-187, 2009.

MACHADO, J.G.; MORAES, J.R.C.M.; COSTA, R.T.; NASCIMENTO, E.; MOREIRA, E. C. Comparação dos resultados dos métodos de imunofluorescência indireta e ELISA indireto no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina realizada pelos laboratórios de Belo Horizonte, MG, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 1, p. 47-51, 2007.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n.4, p. 274-287, 2008.

- MAIA-ELKHOURI, A.N.S.; ALVES, W.A.; SOUSA-GOMES, M.L.; SENA, J.M.; LUNA, E.A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.
- MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 566-567, 1988.
- MANCIANTI, F.; FALCONE, M.L.; GIANNELLI, C.; POLI, A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 59, p. 13-21, 1995.
- MARTINEZ-SUBIELA, S.; STRAUSS-AYALI, D.; CERÓN, J.J.; BANETH, G. Acute phase protein response in experimental canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 197-202, 2011.
- MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.; AMENDOEIRA, M.R. Leishmaniose Visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 41, n. 5, p. 61-84, 1981.
- MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, supl. 2, p. 359-375, 1994.
- MATO GROSSO DO SUL (Estado). Secretaria de Estado de Saúde. **SINAN/MS**, 2007. Disponível em <http://www.saude.ms.gov.br>.
- MATO GROSSO DO SUL (Estado). Secretaria de Estado de Saúde. **Números absolutos de casos de leishmaniose visceral, Mato Grosso do Sul, 2000-2010**. SINAN/MS, 2011. Disponível em <http://www.sgi.ms.gov.br/pantaneiro/sites/saude/index.php?templat=list>. Acesso em 20/11/2011.
- MAURÍCIO, I.L.; STOHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange a case of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 16, p. 188-189, 2000.
- MAURÍCIO, I.L.; GAUNT, M.W.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genetic typing and phylogeny of *Leishmania donovani* complex by PCR. **Parasitology**, v. 122, p. 393-403, 2001.
- METTLER, M.; GRIMMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and get tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dog. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.
- MIGONE, E.E. Un caso de Kalazar em Assunción (Paraguay). **Bulletin Societe Pathologic Exotique**, v. 6, n. 116-120, 1913.

MORAES-SILVA, E.; ANTUNES, F.R.; RODRIGUES, M.S.; DA SILVA JULIÃO, F.; DIAS-LIMA, A.G.; LEMOS-DE-SOUSA, G.; DE ALCANTARA, A.C.; REIS, E.A.; NAKATANI, M.; BADARO, R.; REIS, M.G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; FRANKE, C.R. Domestic swine in a visceral leishmaniasis endemic area produce antibodies against multiple *Leishmania infantum* antigens but apparently resist to *L. infantum* infection. **Acta Tropica**, v. 98, p. 176-182, 2006.

MOREIRA, M.A.; LUVIZOTTO, M.C.; GARCIA, J.F.; CORBETT, C.E.; LAURENTI, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3, p. 245-52, 2007.

MOREIRA JÚNIOR, ED.; SOUZA, V.M.M.; SREENIVASAN, M.; NASCIMENTO, E.G.; CARVALHO, L.P. Assessment of optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. **Veterinary Parasitology**, v.122, p. 245-252, 2004.

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

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAIVA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p. 1561-1577, 2005.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 766-770, 2008.

NEER, M.T.; HARRUS, S. Ehrlichiosis, Neorickettiosis, Anaplasmosis and Wolbachia Infection. **Infection Diseases of the dog and cat**, Philadelphia: Elsevier, p. 203-216, 2006.

NUNES, V.L.B.; YAMAMOTO, Y.; REGO JR.F.A.; DORVAL, M.E.C.; GALATI, E.A.B.; OSHIRO, E.T.; RODRIGUES, M. Estudos epidemiológicos sobre leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 8, n.1, p. 17-21, 1988.

NUNES, C.M.; DIAS, A.K.K.; GOTTARDI, F.P.; PAULA, H.B.D.E.; AZEVEDO, M.A.A.; LIMA, V.M.F.; GARCIA, J.F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para o diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

NUNES, C.M.; PIRES, M.M.; DA SILVA, K.M.; ASSIS, F.D.; GONÇALVES-FILHO, J.; PERRI, S.H. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 131-133, 2010.

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

OLIVEIRA, A.G.; ANDRADE-FILHO, J.D.; FALCÃO, A.L.; BRAZIL, R.P. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo

Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p.933-944, 2003.

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

OLIVEIRA, A.G.; MASSARÁ, AM.; CONSALEZ, C.A.; DORVAL, M.E.C.; FERNANDES, C. E.; DE OLIVEIRA, G.R.; BRAZIL, R.P.; GALATI, E.A. Observations on the feedings habitats of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz; Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Tropica**, v. 107, n.1, p. 238-241, 2008.

OLIVEIRA, C.D.L.; MORAIS, M.H.F.; MACHADO-COELHO, G. L.L. Visceral leishmaniasis in large brazilian cities: challenges for control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2953-2958, 2008.

OLIVEIRA, T.M.E.S.; FURUTA, P.I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R.Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.

OLIVEIRA, T.M.F.S.; VASCONCELOS, E.J.R.; NAKAGHI, A.C.H.; DEFINA, T.P.A.; JUSI, M.M.G.; BALDANI, C.D.; CRUZ, A.K.; MACHADO, R.Z. A novel A2 allele found in *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 42-48, 2011.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; FRANCA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATNIK, M. Impacto do controle canino sobre a epidemiologia da leishmaniose visceral canina e humana no Brasil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n.5, p. 510-7, 2001.

PATTABHI, S.; WHITTLE, J.; MOHAMATH, R.; EL-SAFI, S.; MOULTON, G.G.; GUDERIAN, J.A.; COLOMBARA, D.; ABDOON, A.O.; MUKHTAR, M.M.; MONDAL, D.; ESFANDIARI, J.; KUMAR, S.; CHUN, P.; REED, S.G.; BHATIA, A. Design, Development and Evaluation of rK28-Based Point-of-care Tests for Improving Rapid Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, p. 822, 2010.

PORROZZI, R.; COSTA, M.V.S.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.D.; FERNANDES, A.P.; GAZZINELLI, R.T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, G.JR. Comparative evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral canine. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 544-548, 2007.

QUEIROZ, N.M.G.P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; MACHADO, R.Z.; NUNES, C.M.; STARKE-BUZETTI, W.A. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de

imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 34-40, 2010.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L.M.; DYE, C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. **Parasitology**, v. 115 (Pt 2), p. 143-156, 1997.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; SHAW, M.A. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **Journal Infectious Diseases**, v. 183, p. 1421-1424, 2001.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L.M.; KAYE, P.M.; SHAW, M.A.; DYE, C.; DAY, M.J. IgG subclasses responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 91, n. 3-4, p. 161-168, 2003.

RAJASEKARIAH, G.H.; CARDOSO, L.; DOGCIO, D.A.; MARTIN, S.K.; SMITHYMAN, A.M. A novel exo-antigen-based ELISA for the detection of canine leishmaniasis. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 78, p. 616-623, 2008.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Ecologia das leishmanioses. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro. Fiocruz, cap. 6, 2003.

REGO JR, F.A.; NUNES, V.L.B.; PEREIRA, M.J.S.; CAVALHEIROS, M.E.M.; SILVA, R.P.; BARROS, E. Ocorrência de casos de leishmaniose em cães no município de Corumbá, MS. **In: Resumos do VII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia**, São Paulo, p. 2, 1983.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANCA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/ hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 68-75, 2006.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK W.; TAFURI, W.L.; CORREA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 128, p. 87-95, 2009.

REITHINGER, 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, n. 1, 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, p. 584, 2010.

ROSARIO, E.Y.; GENARO, O.; FRANÇA-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**, v. 100, p. 197-203, 2005.

ROZE, M. Canine leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. **European Journal of Companion Animal Practice**, v. 15, n. 1, p. 39-52, 2005.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and (2) further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1261-1401, 1903.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Revista Clínica Veterinária**, v.2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a Vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical Veterinary Entomology**, v. 12, p. 315-317, 1998.

SANTOS-GOMES, G.; FONSECA, I. P. **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, 1ª ed., v. 1, 2008, 111 p.

SASSAKI, C.Y.; COLODEL, M.M.; FERREIRA, I.; NOGUEIRA, F.S.; LUCHESIS, S.B.; LANGONI, H.; ROCHA, N.S. Comparison of different diagnostic in dogs uninfected and naturally infected with visceral leishmaniasis. **The Journal of Venous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. 348-352, 2011.

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTI, G.; VESCO, G.; MIGONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R.R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A.R.; FRANK, G.R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, n. 104, p. 275-285, 2002.

SHAPIRO T. A.; ENGLUND P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annual Review Microbiology**, v.49, p.117-143, 1995.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **Journal Vector Borne Disease**, v. 45, p. 255-272, 2008.

SHAW, J.J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 577-579, 2006.

SILVA, E.S.; CARVALHO, F.G.; SILVA, E.A.; FRIOZI, E.; OLIVEIRA, A.G.; BRASIL, R.P. Primeiro relato de leishmaniose visceral canina em área urbana do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. In: **Resumos**. XXXVI Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, São Luís, p. 318, 2000.

SILVA, A.V.M.; PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A.; CARREIRA, J.C.A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 324-328, 2005.

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

SILVA, F.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n.1, p. 20, 2007.

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

SILVA, D.A.; MADEIRA, M.F.; TEIXEIRA, A.C.; SOUZA, C.M.; FIGUEIREDO, F.B. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**, n. 179, p. 257-261, 2011.

SIMPSON, L.; MOREL, C.; SIMPSON, A.M. Biological role of extrachromosomal DNA. *In: Modern Genetic Concepts and Techniques in the Study of Parasites*. Ed. Frank Michael, **Tropical Disease Research**, v.4, p. 65-82, 1980.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent avances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal Postgraduated Medicine**, v. 49, p. 55-60, 2003.

SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGGO, M.; VALLADARES, J.E.; FISA, T.; CASTILLEJO, S.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; ARBOIX, M.; PORTUS, M. *Leishmania infantum*-specific IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 265-276, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 86, 2011.

SOUZA, A.I.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; MACHADO, R.Z.; CAMACHO, A.A. Sroprevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Vetrinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 150-152, 2009.

SOUZA, V.R.F.; ALMEIDA, A.B.P.F. Co-infecção entre leishmaniose visceral e erlichiose monocítica em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, n.2, p. 113-117, 2008.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TRAVIS, B.L.; MONTOYA, J.; GALLEGGO, J.; JARAMELLO, C.; LLANO, R.; VELEZ, I.D. Binomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, p. 278-285, 1996.

VIEIRA, R.F.C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A.M.S.; SANTOS, A.P.; SANTOS, R.P.; DUTRA, L.H.; DINIZ, P.P.V.P.; MORAIS, H.A.; BELLE-MESICK, J.B.; LABRUNA, M.B.; VIDOTTO, O. Erliquiose no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.

WERNECK, G.L.; COSTA, C.H.; WALKER, A.M.; DAVID, J.R.; WAND, M.; MAGUINE, J.H. The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis. **Epidemiology**, v. 13, p. 364-367, 2002.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Programme for the surveillance and control of leishmaniasis. <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>. 2001.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Information on leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.html>>. 2004.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. WHO/CTA. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/em/html>. 2010. Acesso em 20 de abr. 2011.

Teste rápido TR-DPP[®] em inquéritos sorológicos para leishmaniose visceral canina na região Centro Oeste do Brasil

Iara Helena Domingos

Médica Veterinária, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (FAMEZ) pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Av. Fillinto Muller, nº 1601, Vila Ipiranga, Campo Grande, MS. E-mail: iarahd@terra.com.br

Ana Luiza Alves Rosa Osório

Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da FAMEZ/UFMS

Veronica Jorge Babo-Terra

Docente da Disciplina Clínica Médica e Terapêutica de Pequenos Animais do Curso de Medicina Veterinária e do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da FAMEZ/UFMS.

RESUMO

A leishmaniose visceral americana, causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* é uma das principais zoonoses mundiais. O cão desempenha papel importante no ciclo de transmissão, sendo alvo de controle pelo Ministério da Saúde, que utiliza o ELISA-Bio-Manguinhos e a IFI-Bio-Manguinhos como diagnóstico sorológico e recomenda a eliminação dos infectados. Novas tecnologias de diagnóstico têm sido desenvolvidas, como o teste rápido imunocromatográfico TR-DPP[®]-Bio-Manguinhos, que passará a fazer parte do protocolo de diagnóstico oficial em 2012. O objetivo deste estudo foi analisar o desempenho dos testes ELISA, IFI e TR-DPP[®] isoladamente em cães assintomáticos de área endêmica para leishmaniose visceral, com diagnóstico parasitológico positivo, por meio da avaliação da sensibilidade dos testes. Também foi realizada comparação entre o protocolo de diagnóstico vigente, ELISA seguido da IFI e o proposto, TR-DPP[®] seguido do ELISA. Quando esses foram comparados ao parasitológico e usados isoladamente, a IFI apresentou sensibilidade de 89,9% e o TR-DPP[®] e ELISA de 83,2%. Aplicados em série, o protocolo de diagnóstico TR-DPP[®] e ELISA teve concordância boa, segundo classificação Kappa, com o ELISA e IFI, e não houve diferença significativa entre o número de animais infectados diagnosticados nos dois protocolos. O TR-DPP[®] se destaca pela rapidez do resultado e por dispensar laboratório especializado.

Palavras-chave: *Leishmania*. Métodos diagnósticos. Cães

ABSTRACT

American visceral leishmaniasis, caused by *Leishmania (L) infantum chagasi* is one of the major worldwide zoonosis. The dog, which plays an important role in the transmission cycle, is the target of control by the Ministry of Health through the serological diagnosis by ELISA-Bio-Manguinhos and IFI-Bio-Manguinhos and subsequent elimination of infected animals. New technologies have been developed in diagnostic field, among them the rapid diagnostic immunoassay kit TR-DPP[®]-Bio-Manguinhos, which will become part of the official diagnosis of the Ministry of Health in 2012. The objectives of this study were to analyze the sensitivity of the serological tests (ELISA, IFI and TR-DPP[®]) in samples of asymptomatic dogs with positive parasitological diagnosis of visceral leishmaniasis and to compare the diagnostic protocol in use, ELISA followed by IFI and the proposed one, TR-DPP[®] followed by ELISA. When compared to the parasitological test and used alone, IFI showed higher sensitivity (89,9%), followed by both TR-DPP[®] and ELISA (83,2%). When used in series, the proposed diagnostic protocol (TR-DPP[®] and ELISA) had good agreement, regarding Kappa classification, with the current protocol (ELISA and IFI) and there was no significant difference between the number of infected animals diagnosed in both protocols. TR-DPP[®] test stands for faster results and for dispensing specialized laboratory.

Keywords: *Leishmania*. Diagnostic methods. Dogs

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral no Brasil é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, transmitido ao homem e a outros mamíferos por meio de fêmeas de flebotomíneos hematófagos do gênero *Lutzomyia* (BRASIL, 2006).

O cão, considerado reservatório doméstico do protozoário, desempenha o papel de fonte imediata para o vetor, devido à presença de formas amastigotas na pele (PALATNICK-DE-SOUZA, 2001). A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem (BRASIL, 2006). Por ser o cão um importante hospedeiro e fonte de infecção para os vetores, é um dos alvos na estratégia de controle da doença (GONTIJO; MELO, 2004).

O estado clínico do cão está diretamente relacionado ao tipo de resposta imunológica celular ou humoral. Cães infectados apresentam níveis aumentados de anticorpos principalmente da classe IgG, não correlacionados à proteção e sim à sintomatologia (COURTENAY et al., 2002). Os anticorpos específicos são verificados até cinco meses após a infecção e seus níveis podem estar elevados antes da manifestação dos sinais clínicos, sendo

facilmente detectados em animais sintomáticos (BARBIÉRI, 2006; MARTINEZ-SUBIELA et al., 2011). Títulos de anticorpos positivos podem indicar que um cão infectado provavelmente desenvolverá a doença, sendo estratégico, portanto, rastrear anticorpos como forma de detectar infecção precoce em cães saudáveis (SOLANO-GALLEGO et al., 2011), pois dependendo da fase da doença muitos cães infectados apresentam-se assintomáticos, mas mesmo assim são fontes de infecção para os flebotomíneos (PALATNICK-DE-SOUZA et al., 2001).

Devido a sua importância epidemiológica, o controle de reservatórios domésticos por meio da eutanásia de animais infectados é um dos componentes do enfrentamento da doença pelo Ministério da Saúde por meio do Programa Brasileiro de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), de forma que o diagnóstico laboratorial é uma importante ferramenta para a identificação de animais positivos. O diagnóstico parasitológico é o método de certeza e se baseia na observação direta de formas amastigotas de *Leishmania* em diferentes tecidos. Porém, é importante ressaltar que este método apresenta limitações tanto pela sensibilidade quanto por dificuldades técnicas ou operacionais, não sendo recomendado para uso em inquéritos caninos. O método recomendado atualmente para esse fim é a utilização de testes em série, Ensaio Imunoenzimático (ELISA) como triagem e Imunofluorescência Indireta (IFI) (titulação $\geq 1:40$) como teste confirmatório (BRASIL, 2006).

Métodos de diagnóstico mais precisos, que forneçam resultados mais rápidos e que independam de infraestrutura laboratorial são cada vez mais investigados (DOURADO et al., 2007). Nesse sentido, o desenvolvimento dos testes rápidos imunocromatográficos utilizando o antígeno recombinante k39 mostrou-se bastante promissor no diagnóstico da doença humana com excelentes resultados na Índia e Nepal (CHAPPUIS et al., 2007). Mais recentemente, abordando limitações dos resultados obtidos com a proteína k39, Pathabbi et al. (2010) compararam sua precisão diagnóstica com uma proteína de fusão (k9, k26 e k39) denominada poliproteína recombinante k28 e os resultados indicaram grande potencial como ferramenta diagnóstica da leishmaniose visceral.

Dentre as novas tecnologias para o diagnóstico sorológico da LVC inclui-se o teste rápido *Dual Path Platform* (TR-DPP[®] - Leishmaniose Visceral Canina), patenteado pela Chembio Diagnostics e desenvolvido pelo Instituto Biomanguinhos/Fiocruz (FUNED, 2010). Trata-se de um ensaio imunocromatográfico de triagem que emprega de um lado, a combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal, e de outro, antígenos recombinantes k28 (fusão do rk39, rk26 e rk9) específicos de *Leishmania* ligados a uma

membrana. Se houver a presença de anticorpos anti-*Leishmania* na amostra testada, estes reagirão com os antígenos recombinantes, e em sequência se ligarão à combinação de proteína A e ouro coloidal, fornecendo o resultado positivo por meio de reação de cor. As vantagens são de um teste rápido, simples e de fácil uso, podendo ser executado a campo (BIO-MANGUINHOS, 2011).

Segundo Nota Técnica Nº. 48 do Ministério da Saúde de agosto de 2011, o TR-DPP® passará a ser o teste de triagem nos inquéritos caninos e o ELISA, o confirmatório, com implantação gradual até o final de 2012 (BRASIL, 2011).

O objetivo deste estudo foi analisar a sensibilidade de cada teste sorológico (ELISA, IFI e TR-DPP®) em amostras de cães assintomáticos de área endêmica com diagnóstico parasitológico positivo de leishmaniose visceral. Também foi realizada a comparação entre o protocolo de diagnóstico da LVC vigente, ELISA seguido da IFI e o proposto pelo MS, TR-DPP® seguido do ELISA, como testes de triagem e confirmatórios respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

1 Animais

Foram estudados 202 cães assintomáticos para LVC, sem raça definida, maiores de quatro meses de idade, de ambos os sexos, entregues ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Campo Grande/MS para eutanásia por serem previamente diagnosticados, por meio de testes sorológicos ou parasitológico, no período de janeiro a agosto de 2011.

2 Coleta de material

De cada animal foi coletada por punção da veia jugular externa uma alíquota de sangue total sem anticoagulante, para a obtenção do soro e realização dos testes sorológicos TR-DPP®, ELISA e IFI. Após a eutanásia do animal foi coletado fragmento do baço e um linfonodo poplíteo para confecção de *imprint* em duas lâminas de cada material e posterior exame parasitológico direto, para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp. Essas provas sorológicas e parasitológicas foram realizadas no Laboratório do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande/MS.

3 Exames sorológicos ELISA e IFI-Bio-Manguinhos

As amostras foram testadas com os *kits* Bio-Manguinhos fornecidos pelo Ministério da Saúde de acordo com as instruções do fabricante, sendo consideradas positivas na IFI aquelas que apresentavam fluorescência na titulação de 1:40, e no ELISA em leituras com valores acima do *cut-off* estabelecido.

4 Exame sorológico TR-DPP[®] - Bio-Manguinhos

As amostras foram testadas conforme instruções fornecidas pelo fabricante, sendo considerado resultado negativo o aparecimento de apenas uma linha: Controle (C) e positivo, de duas linhas: Controle (C) e Teste (T).

5 Diagnóstico parasitológico para leishmaniose visceral canina

As lâminas com impressões de fragmentos do baço e linfonodo foram fixadas em metanol e coradas pela técnica de Giemsa e posteriormente foi feita a pesquisa de formas amastigotas usando microscopia de campo claro com objetiva de 100x. O animal em que em pelo menos uma lâmina foi visualizada a forma amastigota foi considerado positivo para LVC.

6 Análise estatística

Os resultados de cada teste sorológico (ELISA, IFI e TR-DPP[®]) foram expressos em porcentagem. A significância das proporções entre os três testes, desconsiderando os resultados indeterminados, aplicados isoladamente nas amostras dos cães com diagnóstico parasitológico positivo foi verificada pelo teste McNemar.

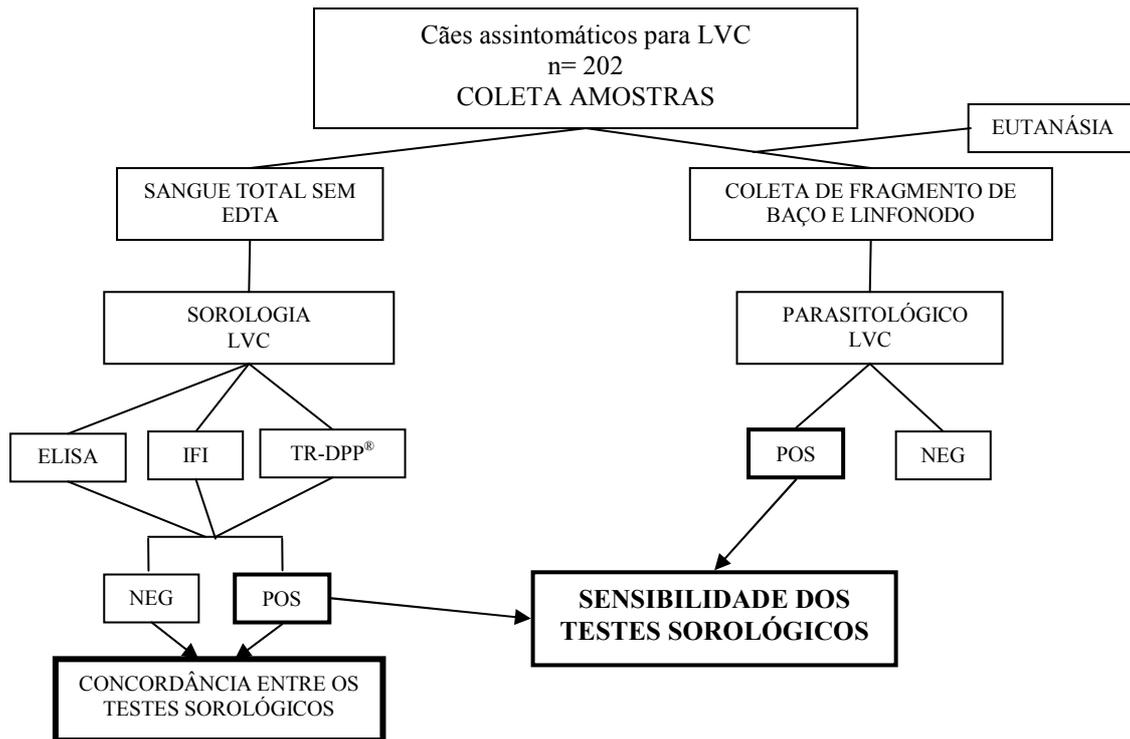
Foi também realizada a comparação dos dois protocolos (vigente e proposto para 2012) e a significância foi verificada pelo teste McNemar. Para essa análise, foram utilizados os animais com exame parasitológico positivo e foram desconsiderados os resultados indeterminados obtidos no ELISA e na IFI.

A concordância nos diagnósticos sorológicos foi calculada conforme classificação de Shrout (1998), usando-se o índice Kappa (k) no qual $k > 0,80$ foi aceito como ótima; $0,60 < k < 0,80$ como boa; $0,40 < k < 0,60$ como regular e $k < 0,40$ como ruim.

7 Delineamento experimental

A Figura 1 registra a sequência de procedimentos laboratoriais realizados para avaliação sorológica e parasitológica dos 202 animais amostrados.

Figura 1 - Procedimentos laboratoriais realizados para avaliação sorológica e parasitológica de 202 cães, assintomáticos, CCZ, Campo Grande, MS, 2011



POS: positivo; NEG: negativo; LVC: leishmaniose visceral canina; ELISA: Ensaio Imunoenzimático; IFI: Imunofluorescência Indireta; TR-DPP: Teste Rápido *Dual Path Platform*

RESULTADOS

A tabela 1 sumariza os resultados dos testes sorológicos ELISA, IFI e TR-DPP[®], além do diagnóstico parasitológico dos 202 animais assintomáticos amostrados.

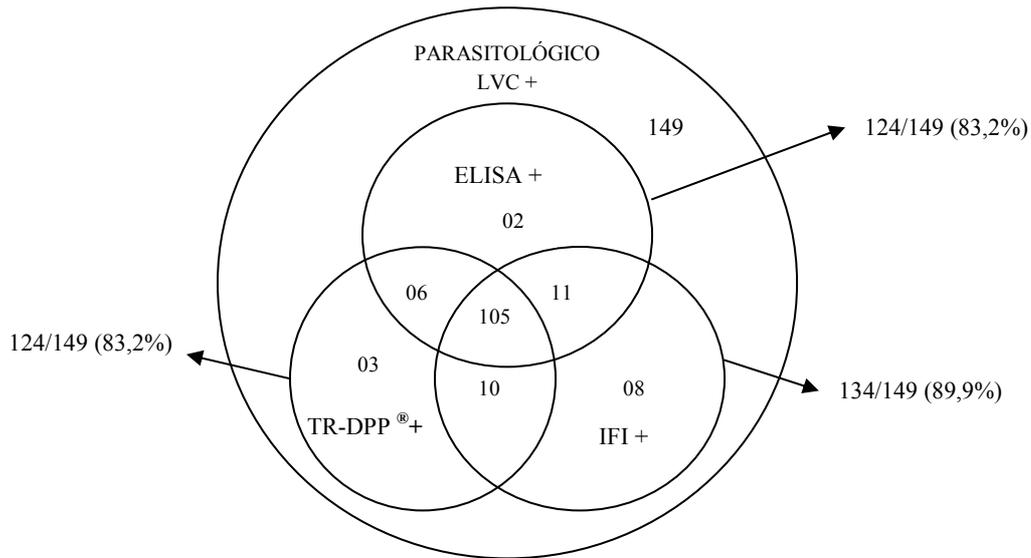
Tabela 1 - Exames sorológicos e parasitológicos para leishmaniose visceral canina (n=202)

Exame parasitológico		ELISA		IFI			TR-DPP [®]		
pos	neg	pos	neg	ind	pos	neg	ind	pos	neg
149	53	170	21	11	178	15	09	162	40
(73,8%)		(84,2%)			(88,1%)			(80,2%)	
202		202		202			202		

POS: positivo; NEG: negativo; ELISA: Ensaio Imunoenzimático; IFI: Imunofluorescência Indireta; TR-DPP: Teste Rápido *Dual Path Platform*

Das 202 amostras analisadas, 149 foram confirmadas como positivas para LVC por meio do diagnóstico parasitológico, e a relação entre os resultados dos testes sorológicos ELISA, IFI e TR-DPP[®], aplicados em paralelo, está na Figura 2.

Figura 2 - Sensibilidade dos testes sorológicos ELISA, IFI e TR-DPP[®] em amostras de cães assintomáticos com diagnóstico parasitológico positivo de leishmaniose visceral (n=149)



As significâncias das comparações entre os testes sorológicos estão registradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Comparações entre os três testes sorológicos aplicados isoladamente nas amostras dos cães com diagnóstico parasitológico de LVC (n=149)

		IFI		ELISA			
		positivo	negativo	positivo	negativo		
TR-DPP [®]	positivo	115	07	111	09	k = 0,10	k = 0,36
	negativo	19	03	13	09	$\chi^2 = 5,538$	$\chi^2 = 0,727$
						$p = 0,02$	$p = 0,39$
ELISA	positivo	116	04	-	-	k = 0,39	
	negativo	11	06	-	-	$\chi^2 = 3,266$	
						$p = 0,07$	

ELISA: Ensaio Imunoenzimático; IFI: Imunofluorescência Indireta; TR-DPP[®]: Teste Rápido *Dual Path Platform*
 McNemar (1gl, χ^2 crítico = 3,841, $p < 0,05$) k: valor Kappa

A comparação entre o protocolo de diagnóstico da LVC vigente, ELISA seguido da IFI e o proposto pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde, TR-DPP[®] seguido do ELISA, como testes de triagem e confirmatórios respectivamente, está analisada na Tabela 3.

Tabela 3 - Comparação entre o protocolo de diagnóstico da LVC vigente e o proposto pelo Ministério da Saúde, aplicados em série nas amostras de cães com diagnóstico parasitológico positivo (n=149)

		Diagnóstico vigente (ELISA + IFI)		Total
		positivo	negativo	
Diagnóstico proposto (TR-DPP [®] + ELISA)	positivo	105	04	109
	negativo	11	18	29
Total		116	22	138

ELISA: Ensaio Imunoenzimático; IFI: Imunofluorescência Indireta; TR-DPP: Teste Rápido Dual Path Platform
McNemar (1gl, χ^2 crítico = 3,84, p<0,05) (χ^2 corrigido = 3,267 com p = 0,071) kappa = 0,64

DISCUSSÃO

A análise isolada dos testes sorológicos aplicados nas amostras dos cães assintomáticos com diagnóstico parasitológico positivo mostrou que a IFI identificou maior número de animais infectados, enquanto o ELISA e o TR-DPP[®] tiveram desempenho equivalente. As significâncias das comparações entre os testes (Tabela 2) mostram diferença significativa apenas entre a IFI e o teste TR-DPP[®] (p=0,02). O melhor desempenho da IFI neste estudo difere do trabalho de Figueiredo et al. (2010) que concluíram que o ELISA apresentou-se melhor no diagnóstico da LVC, quando comparado à IFI realizado com soro e eluato, e de Lira et al. (2006) que também trabalhando com cães com diagnóstico parasitológico, encontraram 72% positivos no ELISA e 68% no IFI e 48% quando realizados em série. Em uma revisão sistemática de pesquisas realizadas até 2008, publicada por Romero e Boelaert (2010), a sensibilidade da IFI variou de 72% a 100% e a do ELISA de 30% a 98% em animais assintomáticos, ambos em relação ao diagnóstico parasitológico.

Neste estudo, a sensibilidade do teste rápido TR-DPP[®] foi coincidente com a do ELISA. De forma semelhante, Reithinger et al. (2002), ao estudarem cães sintomáticos e

assintomáticos, em área endêmica no Brasil, encontraram sensibilidade de 71 a 88% para o ELISA e de 72 a 77% para o teste imunocromatográfico com o antígeno recombinante k39. Da mesma forma, Otranto et al. (2005), ao trabalharem com teste rápido, a partir da mesma proteína, obtiveram sensibilidade de 97,1%, enquanto que para o ELISA obtiveram 98,6%. Em ambos os trabalhos, embora os resultados tenham sido similares, os autores concluíram que o teste rápido mostrou ser uma alternativa vantajosa devido ao custo-benefício. Assim, recomendaram o teste rápido para inquéritos a campo uma vez que demanda um mínimo de equipamento e perícia do manipulador.

Os testes TR-DPP[®] e ELISA, embora equivalentes na proporção de infectados (Figura 2) revelaram concordância ruim (Tabela 2), pois esta análise mostrou que os cães diagnosticados positivos nos infectados, e negativos nos não infectados pelos dois testes, não eram os mesmos cães. A discrepância desta situação é explicada por Falqueto et al. (2009), os quais afirmam que a resposta imune humoral heterogênea que se desenvolve em cães infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi* quase sempre envolve múltiplos antígenos que são reconhecidos de maneiras diferentes em indivíduos distintos e em vários estágios da doença no mesmo hospedeiro. Essa constatação revela claramente que, sempre que possível, é preferível realizar testes em paralelo ou testes com múltiplos antígenos, para identificar um maior número de animais infectados, como mostraram os mesmos autores que obtiveram 100% de sensibilidade quando usaram ELISA com antígeno bruto, com rk39 e com rk26 em paralelo. Da mesma forma, Porrozzi et al. (2007) também obtiveram 100% de sensibilidade utilizando ELISA com os mesmos antígenos, além do recombinante A2. Neste trabalho, dos 149 animais positivos no exame parasitológico, 145 (97,3%) foram diagnosticados quando usados os três testes em paralelo (Figura 2).

Costa et al. (2003) demonstraram, por meio de testes rápidos com antígeno rk39, sensibilidade de 96% e especificidade de 100% para o diagnóstico da LVC. No mesmo estudo, testes usando antígeno rk26 foram igualmente específicos, mas menos sensíveis do que aqueles que utilizaram rk39. No entanto, os dois antígenos associados se completaram aumentando a sensibilidade do teste, o que reforça a importância do TR-DPP[®] por combinar três proteínas recombinantes (rk9, rk26 e rk39).

Ainda, a elevada sensibilidade encontrada por meio de diagnósticos sorológicos em animais assintomáticos neste estudo pode sugerir possível adaptação do hospedeiro ao parasito na região estudada, de forma que o aparecimento de anticorpos detectáveis tenha precedido o aparecimento dos sintomas. Maia et al. (2012), em revisão sistemática, relataram variabilidade considerável nos resultados dos estudos realizados com antígeno recombinante

k39. Foram demonstradas variações da sensibilidade e especificidade associadas com a região geográfica em que o teste foi realizado. Diferenças no desempenho entre as regiões são provavelmente atribuíveis às concentrações de anticorpos, que podem por sua vez estar ligadas a diferentes padrões de idade, imunidade, estado nutricional do paciente ou diversidade do parasito (TDR, 2010).

Cabe ressaltar que o resultado do teste TR-DPP[®] encontrado neste estudo em animais assintomáticos (83,2%) com parasitológico positivo foi melhor se comparado ao encontrado por Grimaldi et al. (2012) utilizando o mesmo teste nas mesmas condições de estudo (47%), embora em animais sintomáticos, os mesmos autores tenham detectado 98%. A baixa sensibilidade dos testes sorológicos em animais assintomáticos relatada na literatura pode ser explicada pelo incremento na produção de anticorpos com a progressão da doença (Oliva et al., 2006).

Segundo normas vigentes do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil, um cão é considerado soropositivo para a doença quando apresenta diagnóstico positivo nos dois testes (ELISA e IFI), realizados em série (BRASIL, 2006). Neste estudo, a comparação entre o protocolo de diagnóstico atual e o que deverá ser implantado (TR-DPP[®] e ELISA) demonstrou não haver divergência quanto à sensibilidade ($p=0,071$), além de possuírem boa concordância ($k=0,64$). Embora essas duas estratégias de diagnóstico sejam equivalentes, o uso do TR-DPP[®] como teste de triagem é promissor em programas de saúde pública, tendo em vista a facilidade e rapidez na realização do teste pelo princípio da imunocromatografia. Além disso, o teste é compatível com diferentes tipos de fluidos biológicos: sangue, soro ou plasma, e apenas uma gota de sangue do animal é suficiente para triagem eficaz no próprio local da coleta.

CONCLUSÃO

Os testes sorológicos avaliados isoladamente mostram alta sensibilidade no diagnóstico da LV em cães assintomáticos.

O protocolo para o diagnóstico da LVC proposto (TR-DPP[®] e ELISA) pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral, aplicado em série apresenta concordância boa com o protocolo vigente (ELISA e IFI), sem diferença significativa entre o uso de um ou de outro no número de animais infectados diagnosticados, destacando-se o uso do TR-DPP[®] pela rapidez do resultado e dispensa de laboratório especializado.

REFERÊNCIAS

- BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p. 329-37, 2006.
- BIO-MANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. TR DPP®
Leishmaniose Visceral Canina. Teste Rápido qualitativo para detecção de anticorpos de cão para *Leishmania*. **Bio-Manguinhos**, Rio de Janeiro, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral**. Brasília. 1. ed. 120 p. 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Subcoordenação de Zoonoses Vetoriais e Raiva. Nota Técnica n. 48/2011-UVR/CGDT/DEVEP/SVS/MS. Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde. Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_48_2011_diagnostico_lvc_19_9_2011.pdf. Acesso em 25 set. 2011.
- 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 Publishing Group**, v. 5, p. 873-882, 2007.
- 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. **The Journal of Infectious Diseases**, n.186, p. 1314-20, 2002.
- COSTA, R.T.; FRANÇA, J.C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; GENARO, O.; CAMPOS-NETO, A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and hygiene**, v. 97, p. 678-682, 2003.
- DOURADO, Z.F.; SILVA, H.D.; SILVEIRA-LACERDA, E.P.; GARCIA-ZAPATA, M.T.A. Panorama histórico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rk39). **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 3, p. 205-214, 2007.
- FALQUETO, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.B.; PARROZZI, R.; COSTA, M.V.S.; TEVA, A.; CUPOLILLO, E.; CAMPO-NETO, A.; GRIMALDI, G.JR. 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, n. 4, p. 559-565, 2009.
- FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M.F.; NASCIMENTO, L.D.; ABRANTES, T.R.; MOUTA-CONFORT, E.; PASSOS, S.R.L.; SCHUBACH, T.M. Canine Visceral Leishmaniasis: Study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 52, n. 4, p. 193-196, 2010.

- FUNED. Fundação Ezequiel Dias. Funed valida teste mais rápido para leishmaniose visceral canina. **FUNED**, Minas Gerais, abr. 2010. Disponível em: <http://www.isaude.net/pt-BR/noticias/6636/geral/funed-valida-teste-mais-rapido-para-leishmaniose-visceral-canina.htm>. Acesso em: 19 ago. 2010.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.
- GRIMALDI, G.JR.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.B.; PINTO, I.S.; AZEVEDO, C.T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP[®]CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 54-59, 2012.
- LIRA, R.A.; CAVALCANTI, M.P.; NAKAZAMA, M.; FERREIRA, A.G.; SILVA, E.D. Canine visceral leishmaniasis: a comparative analysis of canine visceral leishmaniasis EIE-Biomanguinhos Kits and IFI-Biomanguinhos canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 11-16, 2006.
- MAIA, Z.; LÍRIO, M.; MISTRO, S.; MENDES, C.M.C.; MEHTA, S.R.; BADARO, R. Comparative Study of rk39 *Leishmania* Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review with Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical diseases**, v. 6, p. 1484, 2012.
- MARTINEZ-SUBIELA, S.; STRAUSS-AYALI, D.; CERÓN, J.J.; BANETH, G. Acute phase protein response in experimental canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 197-202, 2011.
- OLIVA, G.; SCALONE, A.; MANZILLO, V.F.; GRAMICCIA, M.; PAGANO, A.; DI MUCCIO, T.; GRADONI, L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 1318-1322, 2006.
- OTRANTO, D.; PARADIES, P.; SASANELLI, M.; LEONE, N.; CAPRARIIS, D.; CHIRICO, J.; SPINELLI, R.; CAPELLI, G.; BRANDONISIO, O. Recombinant k39 dipstick immunocromatographic test: new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p. 32-37, 2005.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; FRANCA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATNIK, M. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n.5, p. 510-7, 2001.
- PATTABHI, S.; WHITTLE, J.; MOHAMATH, R.; EL-SAFI, S.; MOULTON, G.G.; GUDERIAN, J.A.; COLOMBARA, D.; ABDOON, A.O.; MUKHTAR, M.M.; MONDAL, D.; ESFANDIARI, J.; KUMAR, S.; CHUN, P.; REED, S.G.; BHATIA, A. Design, Development and Evaluation of rK28-Basead Point-of-care Tests for Improving Rapid Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **PloS Neglected Tropical Diseases**, 4 (9): e822, 2010.

PORROZZI, R.; COSTA, M.V.S.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.D.; FERNANDES, A.P.; GAZZINELLI, R.T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, G.JR. Comparative evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral canine. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 544-548, 2007.

REITHINGER, R.; QUINELL, R.J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C.R. Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs: Comparative Study Using an Immunocromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2352-2356, 2002.

ROMERO, G.A.; BOELAERT, M. Controle da leishmaniose visceral na América Latina: uma revisão sistemática. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. 584, 2010.

SHROUT, P.E. Measurement reliability and agreement in psychiatry. **Statistical Methods Medical Research**, v. 7, p. 301-317, 1998.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, v. 4, p. 86, 2011.

TDR – Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Visceral Leishmaniasis Rapid Diagnostic Test Performance WHO: Diagnostic Evaluation Series, 2010, 44 p.

Interferência da infecção por *Ehrlichia canis* no teste sorológico TR-DPP®

Iara Helena Domingos

Médica Veterinária, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Av. Fillinto Muller, nº 1601, Vila Ipiranga, Campo Grande, MS. E-mail: iarahd@terra.com.br.

Ana Luiza Alves Rosa Osório

Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da FAMEZ/UFMS.

Veronica Jorge Babo-Terra

Docente da Disciplina Clínica Médica e Terapêutica de Pequenos Animais do Curso de Medicina Veterinária e do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da FAMEZ/UFMS.

Antonio Francisco de Souza Filho

Médico Veterinário, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela FAMEZ/UFMS.

Manoel Sebastião da Costa Lima-Junior

Docente do Instituto Federal de Mato Grosso do Sul, campus Nova Andradina.

RESUMO

A leishmaniose visceral americana, causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* é uma das principais zoonoses mundiais. O cão, considerado reservatório doméstico da doença, desempenha papel importante no ciclo de transmissão, sendo alvo de controle pelo Ministério da Saúde que passa a utilizar no diagnóstico sorológico da doença o TR-DPP®-Bio-Manguinhos como triagem e o ELISA-Bio-Manguinhos como teste confirmatório, e recomenda a eliminação dos infectados. Dos problemas elencados no diagnóstico sorológico de cães positivos, o mais especulado é a reação cruzada com *Ehrlichia canis*, responsável pela erliquiose monocítica canina. Com a combinação de resultado sorológico para leishmaniose e parasitológico para as duas doenças em 554 cães, foi possível pesquisar a interferência da erliquiose no diagnóstico da leishmaniose. A análise estatística revelou que não há associação entre ter mórulas de *Ehrlichia canis* e ter apresentado reação positiva no teste sorológico TR-DPP®. Embora não significativa, a análise de associação revelou 20 cães com TR-DPP® positivo, mórula de *Ehrlichia canis*, mas sem o encontro de amastigotas. Nas amostras destes 20 cães, 12 mostraram amplificação para o gênero *Leishmania* na PCR, ratificando não existir interferência entre a presença de mórulas de *Ehrlichia canis* e o resultado positivo do TR-DPP® em animais negativos no teste parasitológico para leishmaniose.

Palavras-chave: *Leishmania*. Reação cruzada. Teste rápido. Erliquiose

ABSTRACT

American visceral leishmaniasis, caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* is one of the major worldwide zoonosis. The dog, considered the domestic reservoir of the disease, plays an important role in the transmission cycle, and is the target of control by the Ministry of Health, which will begin to use TR-DPP®-Bio-Manguinhos test as screening method and ELISA-Bio-Manguinhos as confirmatory test, with the recommendation of removal of infected animals. Among the problems listed related to the serological diagnosis of positive dogs, the most speculated is the possibility of cross-reaction with *Ehrlichia canis*, responsible for canine monocytic ehrlichiosis. Using a combination of serological and parasitological results for both diseases in 554 dogs, it was possible to determine the interference of ehrlichiosis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. The statistical analysis showed that there is no association between the presence of morulae of *Ehrlichia canis* and positive result in TR-DPP® test. Although not significant, the association analysis revealed 20 dogs with positive TR-DPP® and the presence of *Ehrlichia canis* morulae, but without leishmania amastigotes. In the samples of these 20 dogs, 12 showed amplification of the genus leishmania by PCR, ratifying the non-existence of interference between the presence of *Ehrlichia canis* morulae and the positive result in TR-DPP® in animals with negative parasitological test for CVL.

Keywords: *Leishmania*. Cross reaction. Rapid test. Ehrlichiosis

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral no Brasil é causada pelo protozoário *Leishmania (L.) infantum chagasi*, transmitido aos mamíferos, incluindo o homem, por meio de fêmeas de flebotomíneos hematófagos do gênero *Lutzomyia* (BRASIL, 2006).

O cão representa importante papel na epidemiologia da leishmaniose, devido ao grande número de casos e ao intenso parasitismo de pele, considerado assim, a principal fonte de infecção para os vetores em área urbana e, portanto, um dos alvos das estratégias de controle da doença que recomendam a eutanásia de cães soropositivos (GONTIJO; MELO, 2004).

A doença no cão varia de algumas alterações clínicas até o grave acometimento do organismo seguido de morte. O espectro clínico está diretamente relacionado ao tipo de resposta imunológica, seja celular ou humoral, dependendo do equilíbrio entre elas, e da virulência do parasito (OLIVEIRA et al., 2011). A resposta humoral, não imunoprotetora, promove aumento dos anticorpos específicos que podem estar elevados mesmo antes da manifestação clínica da doença. Já a resposta celular mediada por citocinas (IL-2, TNF,

Interferon gama) produzidas principalmente por células T(Th1 CD4+) está ligada à resistência ao desenvolvimento da leishmaniose (BARBIÉRI, 2006).

Diante das limitações dos métodos diretos de observação das formas amastigotas de *Leishmania*, como baixa sensibilidade diagnóstica devido à variação no parasitismo e das dificuldades técnicas ou operacionais (GONTIJO; MELO, 2004), o diagnóstico sorológico baseado na detecção de anticorpos constitui o método utilizado pelo Programa Brasileiro de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) do Ministério da Saúde na identificação de cães portadores da leishmaniose visceral canina (LVC). Os exames utilizados nos inquéritos caninos a partir de 2012 serão o TR-DPP[®]- Leishmaniose Visceral Canina como triagem e o ELISA (Ensaio Imunoenzimático) como confirmatório (BRASIL, 2011).

A utilização dos antígenos recombinantes caracterizados pela indução de respostas específicas detectáveis na sorologia (ASSIS et al., 2008), assim como os testes imunocromatográficos, rápidos e de fácil execução, representam avanços nos programas de saúde pública (DOURADO et al., 2007; MAIA; CAMPINO, 2008). O Instituto Biomanguinhos/Fiocruz desenvolveu o teste rápido *Dual Path Platform* (TR-DPP[®]- Leishmaniose Visceral Canina), patenteado pela Chembio Diagnostics (FUNED, 2010). Trata-se de um ensaio de triagem imunocromatográfico que emprega uma fusão de antígenos recombinantes, denominada rk28 (rk9, rk26 e rk39). As vantagens são de um teste rápido, simples e de fácil uso, podendo ser executado a campo (BIOMANGUINHOS, 2011).

Uma das principais desvantagens dos testes sorológicos é a possibilidade de reações cruzadas com outros microorganismos que infectam os cães como os tripanossomatídeos, *Babesia* spp., *Neospora caninum* e membros da Família Anaplasmataceae, correndo-se o risco de eutanasiar um cão falso positivo (IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006; LUCIANO et al., 2009; LOPES et al., 2011; SILVA et al., 2011).

Das possíveis enfermidades causadoras de reações cruzadas, a erliquiose monocítica canina (EMC), causada pela *Ehrlichia canis*, apresenta-se endêmica na maioria dos estados brasileiros e determina alterações clínicas e hematológicas semelhantes às da LVC, tornando-se o principal alvo de especulações entre clínicos veterinários (GOMES; CORDEIRO, 2004; OLIVEIRA et al., 2008; VIEIRA et al., 2011).

Embora haja uma grande variedade de agentes pertencentes à Família Anaplasmataceae que podem infectar o cão, na rotina clínica geralmente não se faz a identificação do gênero e da espécie de bactéria que está afetando o animal, por não haver diferenças quanto ao tratamento, de forma que, segundo Vieira et al. (2011) devido a

Ehrlichia canis ser a principal espécie encontrada em cães no Brasil, esta é a mais incriminada.

Ehrlichia canis é uma bactéria intracitoplasmática obrigatória que infecta leucócitos e possivelmente plaquetas, tem como vetor o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* de distribuição mundial e abundante no Brasil (DUMLER et al., 2001; AGUIAR et al., 2007).

Os sinais clínicos mais frequentemente observados na fase aguda da doença são apatia, anorexia, palidez de mucosa, febre, sangramento nasal, linfadenomegalia e esplenomegalia, podendo evoluir para a cura ou para a fase subclínica e crônica, caracterizada pela produção prejudicada de elementos sanguíneos pela medula óssea, levando à pancitopenia (NEER; HARRUS, 2006). Embora existam diversos métodos diagnósticos para a erliquiose, o método de rotina é a visualização de mórulas no interior de células mononucleares em esfregaços de sangue periférico, principalmente durante a fase aguda da doença (NAKAGHI et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi analisar a possível interferência da infecção por *Ehrlichia canis* nos resultados do teste TR-DPP[®] para LVC.

MATERIAL E MÉTODOS

1 Animais

Foram estudados 554 cães, assintomáticos para leishmaniose, sem raça definida, maiores de quatro meses de idade, de ambos os sexos, entregues ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Campo Grande/MS, no período de janeiro a agosto de 2011, por terem sorologia positiva para LVC ou por apresentarem doenças terminais.

2 Coleta de material

De cada animal foi coletada por punção da veia jugular externa uma alíquota de sangue total sem anticoagulante, para a obtenção do soro e realização do teste de TR-DPP[®] e uma alíquota com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra - acético (EDTA) para a confecção de esfregaço sanguíneo em lâmina e pesquisa de mórulas de *Ehrlichia canis*. Após a eutanásia foi coletado um fragmento do baço e um linfonodo poplíteo para confecção de *imprint* em duas lâminas para cada material e posterior exame parasitológico direto, por meio da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp.

O teste TR-DPP[®] e a pesquisa parasitológica de formas amastigotas foram realizadas no Laboratório do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande/MS. A identificação

molecular do gênero *Leishmania* sp. foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da FAMEZ/UFMS.

3 Exame sorológico TR-DPP®

As amostras foram testadas conforme instruções fornecidas pelo fabricante, sendo considerado resultado negativo o aparecimento de apenas uma linha: (C) Controle e positivo para duas linhas: (C) Controle e (T) Teste.

4 Diagnóstico bacteriológico para erliquiose (DB-EMC)

Após centrifugação da amostra do sangue com EDTA, foi retirada uma pequena alíquota da capa leucocitária que foi colocada sobre uma lâmina e espalhada por meio de *squash*. Após seca, a lâmina foi corada com Giemsa, e a pesquisa de mórulas de *Ehrlichia canis* foi realizada por meio de microscopia óptica com objetiva de 100x.

5 Diagnóstico parasitológico para leishmaniose visceral canina (DP-LVC)

Foram realizadas impressões do baço e linfonodo por aposição do fragmento sobre lâmina microscópica de vidro. As lâminas com impressões foram fixadas em metanol e coradas pela técnica Giemsa e posteriormente foi feita a pesquisa de amastigotas usando microscopia com objetiva de 100x. O animal em que em pelo menos uma lâmina foi visualizada a forma amastigota foi considerado positivo para LVC.

6 Diagnóstico molecular

Extração de DNA de impressões de fragmentos de linfonodo em lâminas coradas com Giemsa

Foram utilizadas lâminas com impressões de fragmentos de linfonodo, coradas pela técnica Giemsa, dos animais que apresentaram sorologia positiva no TR-DPP®, presença de mórula de *E. Canis* e exame parasitológico para LVC negativo. Cada impressão foi lavada com 300 µL de SDS 20%, por meio de raspagem com ponteira de 1 mL e o material foi transferido para microtubo de 1,5 mL. Essa operação foi repetida, e em seguida foram adicionados 300 µL de tampão de lise (NaCl 1 M; Tris-HCl 1 M pH 8,0; EDTA 0,5 M pH 8,0) e homogeneizou-se em *vortex* para incubar a 65°C por 5 minutos. Após a incubação, foram pipetados 400 µL de clorofórmio no tubo, e agitou-se em *vortex* até completa homogeneização. Centrifugou-se a 10.000 x g por 10 minutos. A fase aquosa foi pipetada cuidadosamente e transferida para novo tubo de 1,5 mL. Adicionou-se 1 mL de etanol 100% e o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e

foi acrescentado 1 mL de etanol 70% para a centrifugação a 10.000 x g por 2 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se a lavagem do DNA com etanol 70% por mais duas vezes e em seguida, inverteram-se os tubos para secagem do sedimento. O precipitado foi ressuspensão com 100 µL de água ultra pura autoclavada e incubado a 65°C por 5 minutos. O DNA foi armazenado a - 20 °C até a realização da PCR.

Reação em cadeia da polimerase - PCR

Foram utilizados os oligonucleotídeos 13A (5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3') e 13B (5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3') descritos por Rodgers, Popper e Wirth (1990), que flanqueiam o fragmento conservado do minicírculo de kDNA de *Leishmania* de tamanho estimado em 120 pb. As reações continham entre 3,5-112,6 µg de DNA, 0.174 pmol de cada oligonucleotídeo, 12 µl de GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega) para um volume final de 24 µl. Para o controle positivo da reação foi utilizado DNA de *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75) fornecidos pelo Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz (Belo Horizonte, Brasil), e como controle interno da reação, água ultra-pura. As amplificações foram feitas em Mj Mini Termociclador, Bio-Rad com a seguinte ciclagem: 95 °C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto para desnaturação, 65 °C por 1 minuto para anelamento, 72 °C por 1 minuto para extensão e mais uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Eletroforese em gel de agarose

A verificação da amplificação do fragmento de DNA de *Leishmania* foi realizada utilizando-se 10 µL do produto da PCR e marcador molecular de 100 pares de base (TRACKIT 100 BP DNA LADDER, Invitrogen) aplicados em gel de agarose a 2% e submetidos a eletroforese submarina horizontal em tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA (TBE) 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico e 2 mM EDTA pH 8,0) a 40 v e 400 mA. Utilizou-se a coloração com *Sybr Gold* (Invitrogen) para visualização em transiluminador UV, no sistema de fotodocumentação Gel Doc™ XR.

7 Análise estatística

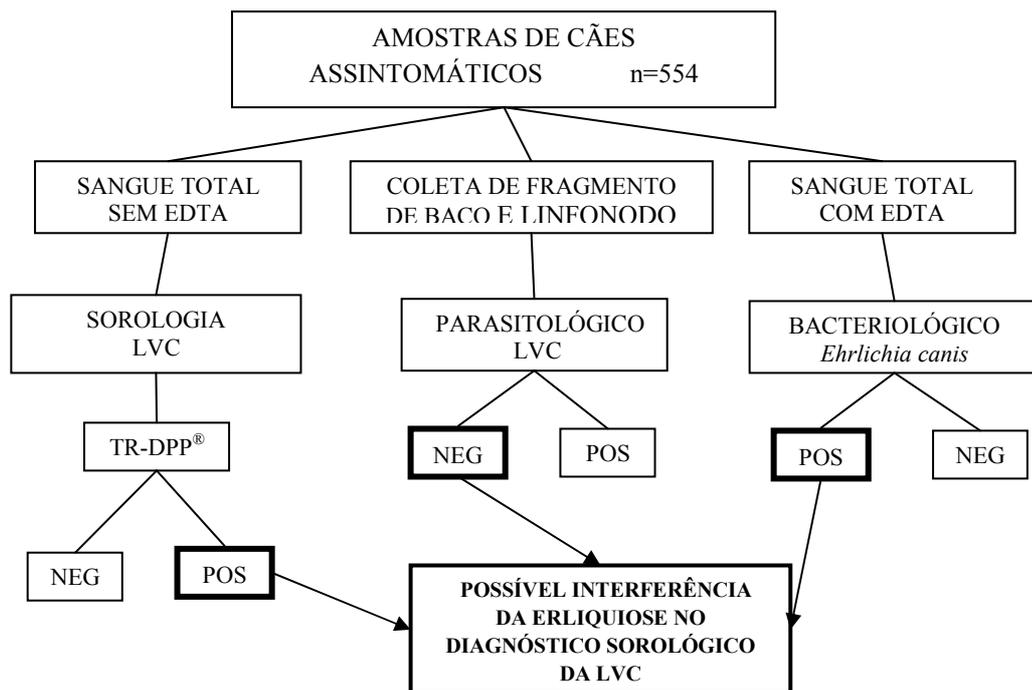
As frequências de positividade no teste sorológico TR-DPP® e nos exames parasitológicos foram expressas em porcentagem.

A significância entre os desvios observados nos testes TR-DPP[®] e presença de mórulas de *Ehrlichia canis* (DB-EMC) foi analisada a partir da composição da tabela de contingência, pelo teste de χ^2 (1 gl, χ^2 crítico = 3,84, $p < 0,05$).

8 Delineamento experimental

A Figura 1 registra a sequência de procedimentos laboratoriais realizados como critérios de inclusão e exclusão para compor a amostragem e posterior investigação da possível interferência da infecção por *Ehrlichia canis* nos resultados do teste TR-DPP[®] para LVC. Como critério de inclusão foram consideradas as amostras com sorologia positiva para LVC, negativas quanto à presença de formas amastigotas em fragmentos de linfonodo e baço e positivas quanto à visualização de mórulas de *Ehrlichia canis*.

Figura 1 - Procedimentos laboratoriais realizados para avaliação sorológica e parasitológica dos 554 animais



POS: positivo; NEG: negativo; LVC: leishmaniose visceral canina; ELISA: Ensaio Imunoenzimático; IFI: Imunofluorescência Indireta; TR-DPP: Teste Rápido *Dual Path Platform*

Adicionalmente, nas amostras negativas quanto à presença de formas amastigotas em fragmentos de tecido e positivas quanto a presença de mórulas de *E. canis*, foi realizada PCR para confirmação ou não da condição de negativas para LVC.

RESULTADOS

A Tabela 1 sumariza os resultados da avaliação sorológica pelo diagnóstico rápido TR-DPP[®] e parasitológica pela pesquisa de amastigotas (DP- LVC) e de mórulas de *Ehrlichia canis* (DB-EMC) dos 554 animais amostrados.

Tabela 1 - Exames sorológicos e parasitológico para leishmaniose visceral canina e bacteriológico para erliquiose monocítica canina, nas infecções isoladas e em coinfeção (n=554)

DP-LVC		TR-DPP [®]		Coinfeção		
				DP-LVC DB-EMC	DB-EMC	
positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo
331	223	256	298	115	178	376
59,7%	40,3%	46,2%	53,8%	20,8%	32,1%	67,9%

DP-LVC: diagnóstico parasitológico para leishmaniose visceral canina; DB-EMC: diagnóstico bacteriológico para erliquiose monocítica canina; TR-DPP: Teste Rápido *Dual Path Platform*

A análise da associação entre as amostras com sorologia positiva para LVC, negativas quanto à presença de formas amastigotas em fragmentos de tecido e positivas quanto à visualização de mórulas de *Ehrlichia canis* está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Associação entre o diagnóstico sorológico TR-DPP[®] e a presença de mórulas de *Ehrlichia canis* em animais com exame parasitológico para LVC negativo

		Mórulas de <i>Ehrlichia canis</i>		
		positivo	negativo	total
TR-DPP [®]	positivo	20	44	64
	negativo	43	116	159
total		63	160	223

TR-DPP[®] - Teste Rápido *Dual Path Platform*

(χ^2 crítico = 3,84, p<0,05) (χ^2 corrigido = 0,399 com 0,5 ≤ p ≤ 0,7)

Das 20 amostras com exame parasitológico negativo que apresentaram mórulas de *E. canis*, 12 revelaram por PCR positividade para o gênero *Leishmania*.

DISCUSSÃO

A positividade (32,1%) no exame bacteriológico de capa leucocitária para EMC encontrada neste trabalho supera os parâmetros nacionais, já que em uma recente revisão sobre a erliquiose no Brasil, Vieira et al. (2011) registraram positividade que varia de 2% a 17%. Na realização de testes bacteriológicos, apenas o percentual de 48,6% encontrado por Faria et al. (2010), em preparações de baço supera este achado, entretanto cabe destacar que este procedimento não se aplica à rotina clínica por ser invasivo.

Embora a frequência da erliquiose neste estudo tenha se mostrado alta se comparada a outros estudos no Brasil (VIEIRA et al., 2011), a coinfeção com LVC não foi tão expressiva, pois a copositividade no diagnóstico parasitológico para leishmaniose e bacteriológico para erliquiose de 20,8% é menor do que aquela obtida por Mekuzas et al. (2008). Esses autores acompanharam 43 cães introduzidos em uma área endêmica para LVC e erliquiose, encontraram 34 cães infectados com *Ehrlichia canis* em 35 infectados com *Leishmania infantum* (97,1%) diagnosticados por PCR, assim como Oliveira et al. (2008), que ao trabalharem com uma população diagnosticada com LVC pelos testes ELISA e IFI, encontraram 43% de erliquiose usando um teste de ELISA, confirmando a coinfeção entre as doenças. Cabe ressaltar que há a possibilidade dos resultados deste estudo estarem subestimados, em decorrência dos métodos de diagnósticos utilizados serem poucos sensíveis, embora específicos.

Os valores observados na Tabela 2 revelam que não há associação entre apresentar mórula de *Ehrlichia canis* e ter apresentado reação positiva no teste sorológico TR-DPP[®] ($0,5 \leq p \leq 0,7$). Embora não significativa, a análise de associação revela 20 cães com sorologia positiva, sem o encontro de amastigotas, que poderiam tratar-se de casos de coinfeção com *Ehrlichia canis*. Esta situação foi parcialmente elucidada pela PCR, na qual 12 das 20 amostras analisadas mostraram amplificação para o gênero *Leishmania*. Tal resultado poderia ser esperado, já que a PCR é uma técnica bastante sensível, além de específica, ao contrário do exame parasitológico direto, que embora específico, tem baixa sensibilidade devido à variação no parasitismo e às dificuldades técnicas (GONTIJO; MELO, 2004; ROMERO; BOELAERT, 2010).

Dessa forma, a constatação de positividade para LVC por meio da PCR ratifica a inexistência de associação entre a presença de mórula e apresentar resultado positivo no TR-DPP[®]. Além disso, a sensibilidade da PCR poderia ser incrementada se o DNA fosse extraído diretamente de outros materiais biológicos, como medula óssea, baço ou linfonodo (GOMES et al., 2008) e não de impressões de linfonodo como delineado neste estudo.

Outra estratégia para testar esta associação entre os testes TR-DPP[®] e presença de mórulas de *Ehrlichia canis* seria repetir o estudo em área não endêmica para LVC.

CONCLUSÃO

Não existe interferência entre a presença de mórulas de *Ehrlichia canis* e o resultado positivo no TR-DPP[®] em animais negativos no teste parasitológico para LVC.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z.; LABRUNA, M.B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007.
- ASSIS, T.S.M.; BRAGA, A.S.C.; PEDRAS, M.J.; BARRAL, A.M.P.; SIQUEIRA, I.C.; COSTA, C.H.N.; COSTA, D.L.; HOLANDA, T.A.; SOARES, V.Y.R.; BIÁ, M.; CALDAS, A.J.M.; ROMERO, G.A.S.; RABELLO, A. Validação do teste imunocromatográfico IT-LEISH[®] para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana, **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 2, p. 107-116, 2008.
- BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p. 329-37, 2006.
- BIO-MANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. TR DPP[®] Leishmaniose Visceral Canina. Teste Rápido qualitativo para detecção de anticorpos de cão para *Leishmania*. **Bio-Manguinhos**, Rio de Janeiro, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral**. Brasília. 1. ed. 120 p. 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Subcoordenação de Zoonoses Vetoriais e Raiva. Nota Técnica n. 48/2011-UVR/CGDT/DEVEP/SVS/MS. Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_48_2011_diagnostico_lvc_19_9_2011.pdf. Acesso em 25 set. 2011.
- DOURADO, Z.F.; SILVA, H.D.; SILVEIRA-LACERDA, E.P.; GARCIA-ZAPATA, M.T.A. Panorama histórico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rk39). **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 3, p. 205-214, 2007.
- DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combination and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE

agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-65, 2001.

FARIA, J.L.M.; DAGNONE, A.S.; MUNHOZ, T. D.; JOÃO, C.F.; PEREIRA, W.A.B.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M. *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 98-102, 2010.

FUNED. Fundação Ezequiel Dias. Funed valida teste mais rápido para leishmaniose visceral canina. **FUNED**, Minas Gerais, abr. 2010. Disponível em: <http://www.isaude.net/pt-BR/noticias/6636/geral/funed-valida-teste-mais-rapido-para-leishmaniose-visceral-canina.htm>. Acesso em: 19 ago. 2011.

GOMES, A.P.S.; CORDEIRO, R.L.R. Reação cruzada no diagnóstico sorológico de leishmaniose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, suplemento 1, p. 238, 2004.

GOMES, Y.M.; PAIVA CAVALCANTI, M.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.; ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **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, n. 3, p. 338–349, 2004.

IKEDA-GARCIA, F.A.; FEITOSA, M.M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, Ano XI, n.62, p.32-38, 2006.

LOPES, M.G; MENDONÇA I.L.; FORTES, K.P.; AMAKU, M.; PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M. Presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* in dogs from Piauí. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p.111-114, 2011.

LUCIANO, R.M.; LUCHESIS, S.B.; TRONCARELLI, M.Z.; LUCIANO, D.M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. São Paulo, v. 46, n. 3, p.181-187, 2009.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n.4, p. 274-287, 2008.

MEKUZAS, Y.; GRADONI, L.; FOGLIA MANZILLO, V.; BANETH, G. *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. **Clinical Microbiology and Infection**, n. 15, p. 30-31, 2008.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 766-770, 2008.

NEER, M.T.; HARRUS, S. Ehrlichiosis, Neorickettiosis, Anaplasmosis and Wolbachia Infection. **Infection Diseases of the dogs and cat**. Philadelphia: Elsevier, p. 203-216, 2006.

- OLIVEIRA, T.M.E.S.; FURUTA, P.I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R.Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.
- OLIVEIRA, T.M.F.S.; VASCONCELOS, E.J.R.; NAKAGHI, A.C.H.; DEFINA, T.P.A.; JUSI, M.M.G.; BALDANI, C.D.; CRUZ, A.K.; MACHADO, R.Z. A novel A2 allele found in *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 42-48, 2011.
- RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology, New York**, v.71, p.267-275, 1990.
- ROMERO, G.A.; BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America – A Systematic Review. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. 584, 2010.
- SILVA, D.A.; MADEIRA, M.F.; TEIXEIRA, A.C.; SOUZA, C.M.; FIGUEIREDO, F.B. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**, n. 179, p. 257-261, 2011.
- VIEIRA, R.F.C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A.M.S.; SANTOS, A.P.; SANTOS, R.P.; DUTRA, L.H.; DINIZ, P.P.V.P.; MORAIS, H.A.; BELLE-MESICK, J.B.; LABRUNA, M.B.; VIDOTTO, O. Erliquiose no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.