



THIAGO PASQUA NARCISO

**INVESTIGAÇÃO DO ESTADO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO
MUNICÍPIO DE LAVRAS – MG**

LAVRAS – MG

2016

THIAGO PASQUA NARCISO

**INVESTIGAÇÃO DO ESTADO DA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA NO MUNICÍPIO DE LAVRAS – MG**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras, como
parte das exigências do Programa de
Pós-graduação em Ciências
Veterinárias, para a obtenção do título
de Mestre.

Orientadora
Dra. Ana Paula Peconick

**LAVRAS – MG
2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Narciso, Thiago Pasqua.

Investigação do estado da leishmaniose visceral canina no município de Lavras - MG. / Thiago Pasqua Narciso. – Lavras : UFLA, 2016.

43 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Ana Paula Peconick.

Bibliografia.

1. Leishmaniose visceral canina. 2. qPCR. 3. ELISA. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

THIAGO PASQUA NARCISO

**INVESTIGAÇÃO DO ESTADO DA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA NO MUNICÍPIO DE LAVRAS – MG**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras, como
parte das exigências do Programa de
Pós-graduação em Ciências
Veterinárias, para a obtenção do título
de Mestre.

APROVADA em 19 de fevereiro de 2016.

Dra. Ana Paula Peconick	UFLA
Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante	UFLA
Dr. Djeison Lutier Raymundo	UFLA
Dr. Ricardo Toshio Fujiwara	UFMG

Orientadora
Dra. Ana Paula Peconick

**LAVRAS – MG
2016**

A todos os cães que contribuíram de alguma forma para a execução deste projeto.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, e a nosso irmão maior Jesus, por todo amparo e proteção ao longo da minha vida.

Aos meus pais, Luiz e Valeria, e minha irmã Adélia, por todo o amor, confiança, paciência e apoio incondicional.

Ao meu avô Carlos, que mesmo tantos anos depois de partida continua sempre ao meu lado.

A minha namorada Carolina, por todo o amor, paciência, cumplicidade e companheirismo em todos os momentos, estando sempre presente nos meus dias mesmo estando tão distante neste momento.

Ao meu amigo Matheus, por ser um irmão mais velho, ouvinte, confidente e companheiro de casa, e sempre estar disposto a ajudar quem precise com seu coração enorme.

Ao meu amigo Bruno, por ser um exemplo de determinação e coragem para enfrentar as dificuldades que a vida nos dá, além de compartilhar muitos ideais de pesquisa e ensino.

Ao meu amigo Adriano, por todo o companheirismo, parceria e momentos inesquecíveis ao longo de mais de uma década.

Ao meu amigo William, pelos momentos de diversão online e por me ouvir em tantas conversas madrugadas a fora.

Ao meu amigo Tarcísio, por ser um grande companheiro de trabalho e estar sempre disposto a me ouvir e ajudar no que for possível, dentro ou fora da universidade.

Aos amigos João, Luiz, Osório, Wagner e Marcos, por todas as conversas e bons momentos compartilhados.

Ao meu sogro Rodrigo, por toda a ajuda e amparo em Belo Horizonte.

À minha sogra Debie, sua mãe Valda e meus cunhados Rafaela e Gustavo, por serem minha segunda família em Guaxupé e me proporcionarem tantos momentos felizes.

Às minhas orientadoras e amigas Joziana e Ana Paula, por todos os ensinamentos, paciência, puxões de orelha e companheirismo desde os tempos de graduação, servindo sempre como exemplos tanto na minha formação pessoal como profissional.

Ao Thales, Carol e Mariana, por serem uma família para mim em Lavras.

Ao Ângelo, Fátima e Renata, por todo o carinho, bons momentos e por serem minha família belo-horizontina.

Ao Programa de Pósgraduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, por proporcionar esta possibilidade de estudar e poder obter o título de Mestre, e a CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Ao setor de Patologia Veterinária da UFLA, e aos professores Flademir, Angélica e Djeison, por todo o apoio ao longo da execução deste projeto.

Ao professor Ricardo Fujiwara da UFMG, por toda a parceria, ajuda, idéias e disponibilidade para a realização deste projeto.

Ao Lucas Dhom, por fornecer todo seu material de trabalho que foi essencial na realização deste projeto.

À Michele e Luiza, por toda a ajuda e paciência na realização do projeto no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas do ICB na UFMG.

Ao apoio concedido pela FAPEMIG através do projeto APQ 02553-14.

A todos os amigos, professores e colaboradores de BIOPAR e NEP, pelos momentos de trabalho, conhecimento e diversão compartilhados.

*“Nem sempre terás o que desejas, mas enquanto estiveres ajudando aos outros
encontrarás os recursos de que precisas.”*

Chico Xavier

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença parasitária de caráter zoonótico, causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. No Brasil, a principal espécie transmissora é *Lutzomyia longipalpis*. Até o ano de 2013, o município de Lavras era considerado, de acordo com os critérios estabelecidos pelo Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, área silenciosa e não vulnerável para a LVC. Frente a dados não oficiais de animais positivos, fez-se necessário à investigação do estado epidemiológico da LVC. O presente trabalho teve como objetivo investigar o estado da LVC no município de Lavras utilizando técnicas moleculares e sorológicas. A infecção por *L. infantum* foi confirmada em amostras de baço e medula óssea de nove cães submetidas à qPCR. Quatro cães foram positivos tanto em amostras de medula óssea como de baço. Para a avaliação dos ensaios sorológicos, o soro de 52 animais foi submetido aos testes DPP®, ELISA Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos e ELISA – rKDDR. Dos 52 animais, foram observados 40 (75%) positivos e 12 (25%) negativos para LVC nos testes DPP® e ELISA Biomanguinhos. Após a realização do ELISA rKDDR, foram observados 34 (65%) animais positivos e 18 (35%) animais negativos, indicando que se faz necessário uma avaliação mais detalhada desse material, a fim de se determinar a ocorrência ou não de reatividade cruzada dos testes DPP® e ELISA Biomanguinhos ou uma possível falha diagnóstica no ELISA rKDDR. Através dos resultados obtidos neste projeto foi possível confirmar, através da qPCR, o primeiro caso de infecção canina pela espécie *Leishmania infantum* no município de Lavras-MG.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, qPCR, ELISA

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a zoonotic parasitic disease caused by *Leishmania infantum*. In Brazil, the main transmitter species is *Lutzomyia longipalpis*. By the year 2013, the city of Lavras was considered, according to the criteria established by the Manual of Surveillance and Control of Visceral Leishmaniasis, quiet area and not vulnerable to the LVC. Face to unofficial data of positive animals, it was necessary to investigate the epidemiological status of the LVC. Given these facts, this study aimed to investigate the status of the LVC in Lavras using molecular and serological techniques. The *L. infantum* infection was confirmed in spleen and bone marrow samples nine dogs subjected to *qPCR*. Four dogs were positive in both bone marrow and spleen samples. For the evaluation of serological tests, serum of 52 animals was submitted to DPP®, ELISA Canine Visceral Leishmaniasis - Bio-Manguinhos and ELISA - rKDDR. Of the 52 animals, 40 were observed (75%) positive and 12 (25%) negative for the LVC DPP® Biomanguinhos and ELISA tests. After completion of the ELISA DDR, it was observed 34 (65%) positive animals and 18 (35%) negative animals, indicating that it is necessary a more detailed assessment of this material, in order to determine the presence or absence of cross-reactivity test DPP® and ELISA Biomanguinhos or a possible misdiagnosis ELISA rKDDR. Through the results of this project was confirmed by *qPCR*, the first case of canine infection by *Leishmania infantum* in Lavras-MG.

Keywords: *Leishmania infantum*, *qPCR*, ELISA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAT – Teste de aglutinação direta

DPP® - “Dual path plataform”

EIE – Ensaio imunoenzimático

ELISA – Ensaio de imunoadsorção enzimática

HE – Hematoxilina – eosina

IHQ – Imunohistoquímica

LVC – Leishmaniose visceral canina

MCM – Micro cultura de células mononucleares

MHC – “Major histocompatibility complex”

qPCR – Reação em cadeia de polimerase em tempo real quantitativa

rKDDR – “Recombinant Kinesin Degenerated Derived Repeat”

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

SRD – Sem raça definida

WB – “Western Blot”

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Curva-padrão da DNA polimerase de *Leishmania infantum* obtida nas amostras de medula óssea e baço através da qPCR.....29
- Figura 2 Carga parasitária de cães positivos para *Leishmania infantum* a partir de amostras de baço e medula óssea na qPCR.....30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Leishmaniose visceral	16
2.1.1	Ciclo básico e transmissão da leishmaniose visceral canina	16
2.2	Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina	18
2.2.1	Diagnóstico clínico	18
2.2.2	Diagnóstico parasitológico	18
2.2.3	Diagnóstico sorológico	20
2.2.4	Diagnóstico molecular	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo geral	23
3.2	Objetivos específicos	23
4	METODOLOGIA	24
4.1	Local de realização do experimento	24
4.2	Reação em Cadeia de Polimerase em tempo Real quantitativa- <i>q</i> PCR	25
4.3	Seleção dos animais e coleta de soro	26
4.4	ELISA rKDDR	27
4.5	Análise estatística	28
5	RESULTADOS	28
5.1	Confirmação do primeiro caso de LVC no município de Lavras – MG por <i>q</i> PCR	28
5.2	DPP®/ ELISA Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos e ELISA rKDDR	30
6	DISCUSSÃO	31
7	CONCLUSÕES	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina é uma doença de caráter zoonótico, causada por protozoários do gênero *Leishmania* (Família Kinetoplastida; Ordem Trypanosomatidae) que atinge cães de todos os continentes, com exceção da Oceania (DANTAS-TORRES, 2009). Mais de 12 espécies de *Leishmania* já foram detectadas causando a infecção em cães, porém o agente etiológico mais importante da leishmaniose visceral canina é a *Leishmania infantum* (NICOLLE, 1908), espécie também denominada *Leishmania chagasi* (CUNHA; CHAGAS, 1937). No Brasil, bem como em diversos países da América Central e do Sul, Europa, Mediterrâneo e África a *L. infantum* é também responsável pela forma visceral da doença em humanos (BANETH et al., 2008; DANTAS-TORRES, 2012). Sua transmissão entre animais susceptíveis e para humanos nas Américas ocorre de forma majoritária pela picada de fêmeas do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ; NEIVA, 1913), pertencentes à ordem Psychodidae também conhecidos como mosquito-palha (YOUNG; ARIAS, 1992; RIBEIRO et al., 2005). Os cães são considerados os principais reservatórios urbanos da doença (ALVAR, 2004).

No Brasil e no mundo a leishmaniose visceral é considerada uma das doenças parasitárias de maior importância para a saúde pública devida sua elevada morbidade e mortalidade, bem como pelo grande número de casos não relatados (GONTIJO; MELO, 2004). Entre os anos de 1994 e 2009, a média de casos registrados no Brasil foi de 2/100.000 habitantes (DE ARAÚJO et al., 2013). Pelo fato dos cães desempenharem um papel central na epidemiologia da leishmaniose no país, três principais medidas foram estabelecidas para o combate da doença: eliminação de cães positivos, combate às formas adultas do vetor e diagnóstico de humanos positivos seguidos de tratamento (BRASIL,

2014). Embora estudos indiquem que estas medidas podem reduzir drasticamente a transmissão se mantidas por um longo período de tempo (MAGALHAES et al., 1980; DESJEUX, 1996; JERONIMO et al., 2000), pesquisas subsequentes indicaram que cerca de 80% de cães infectados de áreas endêmicas exibem a forma assintomática da leishmaniose e atuam, dessa forma, como fontes ativas de infecção e passam despercebidos pelos testes sorológicos vigentes (DANTAS-TORRES et al., 2006).

O teste de triagem preconizado atualmente pelo Ministério da Saúde é o *Dual Path Platform* (DPP® Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos) seguido do EIE – Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos em soro como confirmatório, segundo estabelecido pela Nota Técnica Conjunta 001/2011 CGDT – CGLAB/DEVIT/SVS/MS, publicada em 29 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011). Porém a aplicação do DPP® e do ELISA Bio-Manguinhos para o diagnóstico e controle da LVC é questionada por diversos autores ao longo dos últimos anos (DE JESUS et al., 2003; GRIMALDI et al., 2012; QUINNEL et al., 2013), que demonstram que os testes possuem falhas que podem resultar na eutanásia de um animal falso positivo, bem como na permanência no ambiente urbano de cães falso-negativos, que atuam como fonte de infecção para os flebotomíneos e colocam dessa forma a população humana em risco. Neste sentido, é de grande importância e necessidade investigar o estado da LVC no município de Lavras, através da utilização de técnicas moleculares que permitam a confirmação da infecção por *L. infantum*, bem como lançar mão do uso de técnicas sorológicas que apresentem maiores valores de sensibilidade e especificidade para auxiliar no diagnóstico desta doença no município.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral, também conhecida como Calazar (kala-azar) é uma doença vetorial que afeta humanos e cães de forma sistêmica (MALLA; MAHAJAN, 2005), possuindo período médio de incubação nestes de 2 a 6 meses e 3 a 7 meses respectivamente, levando à morte de 90% dos humanos infectados caso não haja tratamento (BRASIL, 2006). É também altamente influenciada por fatores socioeconômicos e ambientais (DE ARAÚJO et al., 2013). A doença é causada por espécies de protozoários digenéticos pertencentes ao filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (ROSS, 1903), sendo no Brasil o agente responsável a *Leishmania infantum*, que possui como principal vetor o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (MICHALSKY et al., 2002; DANTAS-TORRES, 2006b)

2.1.1 Ciclo básico e transmissão da leishmaniose visceral canina

Parasitas do gênero *Leishmania* são transmitidos pela picada de insetos pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, também conhecidos popularmente como mosquito-palha, birigui, asa-dura, dentre outras denominações (LAINSON; SHAW, 1978).

No Brasil, o flebotomíneo da espécie *L. longipalpis* é considerado o vetor principal da *L. infantum*, afetando tanto os humanos como os animais domésticos em ambientes urbanos e periurbanos (SACKS; KAMHAWI, 2001; LAINSON; RANGEL, 2005).

No ciclo de vida da *L. infantum*, que necessita tanto do hospedeiro vertebrado (humanos ou cães) como do hospedeiro invertebrado (flebotomíneos)

para se completar, os parasitos podem apresentar formas flageladas (promastigotas e paramastigotas), as quais se desenvolvem no tubo digestivo do flebotômíneo, enquanto que as formas não-flageladas, denominadas amastigotas, desenvolvem-se no interior das células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) dos hospedeiros vertebrados (GRIMALDI; SCHOTTELIUS, 2001). O ciclo se inicia quando a fêmea de flebotômíneo ingere durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro as formas amastigotas. No interior do tubo digestivo do inseto as amastigotas começam a se dividir, e diferenciam-se em promastigotas procíclicas (células alongadas e com flagelo livre). Posteriormente, após o rompimento da membrana peritrófica, os parasitos migram para a região anterior do tubo digestivo do inseto e invadem o esôfago e faringe. Nesta região anatômica, os parasitos se diferenciam em formas infectantes chamadas promastigotas metacíclicas (SCHLEIN, 1993). Durante um novo repasto sanguíneo, a fêmea de flebotômíneo regurgita as formas promastigotas metacíclicas infectantes no local da picada, onde são imediatamente internalizadas por macrófagos residentes ou por células do SFM do hospedeiro vertebrado. No interior dos fagolisossomos, as formas flageladas se diferenciam em amastigotas, que passam a se multiplicar por divisão binária, até que a célula hospedeira se rompa liberando as amastigotas, que serão fagocitadas por macrófagos adjacentes (ALVAR, 2004).

Outras formas de transmissão da *L.infantum* podem ocorrer, tais como vertical, transfusão sanguínea e venérea, porém são consideradas incomuns (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

2.2 Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina

2.2.1 Diagnóstico clínico

Na ausência de manifestações patognomônicas, os sinais clínicos tipicamente encontrados em cães são alterações cutâneas, linfadenomegalia local ou generalizada, letargia, vômito, febre, diarreia perda de peso e caquexia, hepatoesplenomegalia, lesões oculares, alterações renais e onicogribose (MAIA; CAMPINO, 2008). Formas atípicas, como alterações hemostáticas, colite crônica e desordens cardiovasculares, respiratórias, bem como alterações locomotoras e de ordem neurológica também podem ser observadas nos cães (BLAVIER et al., 2001; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Devido ao compartilhamento de sua sintomatologia clínica e alterações patológicas com outras doenças de cães, o diagnóstico clínico da leishmaniose visceral canina é subjetivo e deve ser complementado com outros métodos de diagnóstico (BRITO et al., 2000).

2.2.2 Diagnóstico parasitológico

Os métodos de diagnóstico parasitológicos para LVC de visualização dos parasitos por meio de microscopia são os que apresentam os maiores índices de especificidade, podendo alcançar até mesmo o valor de 100%, (HERWALDT, 1999). Através da coleta de aspirados de medula óssea e baço, bem como biópsias de tecidos vivos, linfonodos e amostras de sangue periférico é possível observar a presença de amastigotas em lâminas fixadas com coloração Giemsa, possuindo sensibilidade entre 60% a 80% em todos os tipos de tecidos

citados anteriormente, com exceção do baço, onde a sensibilidade é de cerca de 93%. Porém, a aspiração é contraindicada em casos em que não se possui experiência, já que a manobra pode levar a uma grave hemorragia e conseqüentemente ao óbito do animal (SUNDAR; RAI, 2002).

O método da imunohistoquímica pode ser utilizado como ferramenta auxiliar no diagnóstico da LVC de forma a complementar o diagnóstico da técnica de hematoxilina-eosina, particularmente em tecidos que podem não apresentar uma carga parasitária elevada (MAIA; CAMPINO, 2008). Esta técnica baseia-se na detecção das formas amastigotas em tecidos fixados em lâminas de microscopia nas quais anticorpos anti-*Leishmania* são adicionados e posteriormente é feita a leitura em microscópio óptico (BOURDOISEAU et al., 1997b, TAFURI et al., 2004). Segundo estudo realizado por Xavier e colaboradores (2006), a técnica de IHQ apresenta valores de sensibilidade superiores quando comparada com a técnica de HE (44,8% e 62,1%, respectivamente).

A cultura de *Leishmania* pode aumentar a sensibilidade do diagnóstico, porém apresenta maior custo e é de lenta execução, o que a torna inviável para o diagnóstico clínico. Contudo alguns novos métodos como a micro cultura (MCM), que utiliza botões leucocitários e células sanguíneas mononucleares, pode aumentar ainda mais a sensibilidade do teste e levar um menor tempo para a sua execução (SRIVASTAVA, 2011).

2.2.3 Diagnóstico sorológico

Diferentes métodos de diagnóstico sorológico para a LVC vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos e, embora sejam utilizados com frequência, a taxa de infecção em populações caninas de áreas endêmicas é geralmente subestimada devido aos altos títulos de imunoglobulinas específicas que os cães podem apresentar, permitindo que a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em diversos animais passe despercebida (ALVAR et al., 2004), já que o aumento do número de anticorpos é geralmente lento e gradual (OLIVA et al., 2006).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) começou a ser utilizada para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina há cerca de 50 anos e até recentemente era considerada uma técnica “padrão-ouro”, devido a características como elevada sensibilidade (85% - 100%) e especificidade (94,7% -100%), maior aplicabilidade em estudos epidemiológicos, rotina clínica veterinária e acompanhamento de cães em tratamento contra a doença (GRADONI, 2002; MANCIANTI et al., 2002; ALVAR et al., 2004). Porém, sua realização requer capacitação do responsável técnico e experiência, bem como laboratórios com equipamentos de custo elevado e diluições seriadas, o que tornam a execução do teste trabalhosa e demorada (MAIA; CAMPINO, 2008).

O ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) é um método que permite a leitura de um elevado número de amostras em um curto período de tempo, no qual se pode encontrar elevados valores de sensibilidade em cães tanto assintomáticos (94,1% –100%) como sintomáticos (100%), lançando mão de antígenos como promastigotas ou amastigotas em meio solúvel para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no soro de cães (METTLER et al., 2005). Antígenos recombinantes utilizados nesta técnica, como a rk39, podem apresentar valores de sensibilidade (95-98,1%) e especificidade (100%) elevados (ROSÁRIO et al., 2005). Um novo antígeno recombinante ainda não disponível

no mercado denominado rKDDR (Kinesin Degenerated Derived Repeat) possui maior sensibilidade (cão 88,54% e 78,13; humano 92,86% e 90,48%, respectivamente) e especificidade (cão 97,30% e 90,09%; humano 100% e 97,92%, respectivamente) em relação a rK39 conforme observado em ensaios comparativos de reconhecimento sorológico canino e humano. Somado a estes fatos, a ELISA rKDDR apresenta melhor desempenho quando comparada com o Kit EIE-LVC, teste sorológico recomendado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da LV canina, indicando que a rKDDR pode ser utilizada para o teste diagnóstico da leishmaniose visceral e contribuir para o controle da infecção em cães e humanos (LEMONS, 2014). A utilização de outros tipos de materiais para a análise de anticorpos, como a urina, pode auxiliar no prognóstico de cães positivos que apresentem quadros de glomerulopatias, conforme observado em estudo prévio por Solano-Gallego (2004). Uma implicação da técnica de ELISA é que a variação entre o material utilizado como antígeno na sensibilização da placa pode influenciar nos resultados, levando ao decréscimo de anticorpos quantificados no soro dos animais (BALEIRO et al., 2006).

Em 2011, o diagnóstico imunológico da leishmaniose visceral canina passou por grandes modificações, sendo estas baseadas em um estudo multicêntrico realizado sob a coordenação do Ministério da Saúde, onde foram avaliadas as metodologias de RIFI, EIE e o teste rápido imunocromatográfico, DPP® - Biomanguinhos (BRASIL, 2011). O DDP® é um ensaio imunocromatográfico para testes de diagnóstico rápido, de caráter qualitativo para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* e que utiliza a proteína recombinante K28 (fragmentos k26, k39 e k9) como antígeno (FUNED, 2013). Embora apresente valores de sensibilidade satisfatórios (76,2%) (MANCIANTI et al. 2002), Reithinger e colaboradores (2002) determinam como principal

desvantagem da fita com rK39 sua baixa especificidade (com valores variando entre 61% e 75%), o que leva a um alto número de cães falso-negativos.

Outros métodos de diagnóstico para a leishmaniose visceral canina como o teste de aglutinação direta (DAT) e o “Western Blotting” (WB) também apresentam elevados valores de sensibilidade e especificidade, porém a obtenção dos resultados é demorada devido a características de seus protocolos de execução, o que restringe a utilização destas técnicas principalmente ao nível acadêmico, sendo ambas de pouca eficácia em estudos epidemiológicos (MEREDITH et al., 1995; SCHALLIG et al., 2002b; FERROGLIO et al., 2007).

2.2.4 Diagnóstico molecular

A técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) em tempo real, em relação a PCR convencional, possui a vantagem de ser um teste quantitativo, o que possibilita sua utilização durante períodos de tratamento e permite avaliar qual o nível de infecção e qual a quantidade de parasitos na amostra com precisão (BOSSOLASCO et al., 2003). É uma técnica baseada no uso de fluorocromos ou sondas fluorescentes que permitem o monitoramento em tempo real do produto amplificado, na qual a análise da emissão de luz é feita por um detector de sinal luminoso associado a um amplificador de sinal que traça um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo de amplificação, e a intensidade do sinal produzido reflete quanto do produto foi amplificado (KUBISTA et al. 2006). A *q*PCR também minimiza os riscos de contaminação do material utilizado pelo fato de não apresentar os diversos passos de manipulação necessários na técnica convencional de PCR, bem como permite a detecção e quantificação da carga parasitária de forma simultânea (VITALE et al. 2004).

A *qPCR* vem sendo utilizada em estudos relacionados à carga parasitária, avaliação da interação parasito/hospedeiro e monitoramento de esquemas terapêuticos a partir de amostras clínicas provenientes de pacientes e de cães com LVC (QUARESMA et al. 2009; KHADEM VATAN et al. 2011; WEIRATHER et al. 2011). De forma a complementar o diagnóstico da LVC através da *qPCR*, Manna e colaboradores (2009) observaram que existe uma relação positiva entre a carga parasitária e as manifestações clínicas da doença, através de um estudo feito em amostras de sangue total e aspirado de linfonodos de cães naturalmente infectados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o estado da leishmaniose visceral canina no município de Lavras – MG utilizando técnicas sorológicas e moleculares.

3.2 Objetivos específicos

- Confirmar o primeiro caso de infecção canina por *Leishmania infantum* no município de Lavras – MG.
- Avaliar o resultado dos testes DPP® Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos e ELISA rKDDR para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina;
- Avaliar o teste ELISA rKDDR para o diagnóstico da LVC com amostras de cães do município de Lavras.

4 METODOLOGIA

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CETEA (CEUA/UFMG, Protocolo 44/2012) e de Ética em Pesquisa – COEP (CAAE –00842112.2.0000.5149) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.1 Local de realização do experimento

Este projeto foi realizado nas dependências da Universidade Federal de Lavras – UFLA e da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, no período de abril de 2014 a novembro de 2015.

No Setor de Patologia Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA foi realizada a coleta de amostras de baço e medula óssea de cães previamente eutanasiados e que se encontravam na câmara fria. Estas amostras foram mantidas em freezer -80°C do Laboratório de Fisiologia e Metabolismo do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, e encaminhadas para análise pela técnica *q*PCR no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas – ICB da UFMG.

O soro canino utilizado neste projeto foi armazenado no Laboratório de Biologia Parasitária da UFLA, e encaminhado para o Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas – ICB da UFMG para a realização do ensaio de ELISA utilizando como antígeno a proteína rKDDR.

4.2 Reação em Cadeia de Polimerase em tempo Real quantitativa – qPCR

A quantificação das amastigotas de *L. infantum* em amostras de baço e medula óssea dos cães foi realizada através da qPCR, a partir de material coletado em nove cães sabidamente positivos pelos testes DPP® e ELISA Biomanguinhos. O DNA dos tecidos foi extraído pelo *DNeasyBlood & Tissue Kit* (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A carga parasitária foi estimada utilizando os *primers Forward*, 5' TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG 3' e *Reverse*, 5' GCA TCG CAG GTG TGA GCA C 3'. O amplicon desses *primers* representam um fragmento de 90 bp do gene de cópia única de DNA polimerase de *L. infantum* (GenBank acesso número AF009147). O gene constitutivo canino β -actina foi utilizado como controle endógeno para normalização inicial de concentrações de DNA e para verificar integridade da amostra. Os *primers* utilizados para amplificar um fragmento de 307 bp do gene foram os seguintes: *Forward*, 5' CTTCTACAACGAGCTGCGCG 3' e *Reverse*, 5' TCATGAGGTAGTCGGTCAGG. A reação foi realizada em um volume total de 10 μ L, contendo 30ng da amostra de DNA, 3p moles de cada primer e 5 μ L de *SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)* diluídos em água para PCR. A reação foi iniciada após desnaturação do DNA a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação (95° C/10 segundos, 60° C/1 minuto). Todas as amostras foram processadas em duplicata. O produto da clonagem do gene de *L. infantum* foi utilizado para a construção da curva padrão. Os vetores contendo os insertos foram inicialmente dosados em espectrofotômetro *NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA)* a 260nm e 280nm, após diluição 1:1000. O resultado da absorbância foi utilizado para calcular a concentração de DNA da amostra. Considerando que no comprimento de onda

de 260nm, a densidade óptica igual a 1 corresponde a 50µg/mL de DNA de fita dupla. A concentração de DNA da amostra (µg/mL) foi então convertida em pmol/µL, e a partir desta concentração, foi obtido o número de moléculas do plasmídeo mais o inserto por microlitro da amostra. Após determinar o número de moléculas por microlitro das amostras, estas foram diluídas sucessivamente na razão dez, e as diluições entre 10^1 até 10^8 moléculas foram utilizadas para a construção da curva-padrão. O software ABI PRISM foi utilizado para a análise dos resultados.

4.3 Seleção dos animais e coleta de soro

Este projeto utilizou dados secundários de 52 amostras de soro provenientes de cães coletadas durante o Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral Canina (PNCLV) realizado no município de Lavras (MG). Os cães avaliados eram errantes, cães do abrigo da Sociedade Lavrense Protetora dos Animais, cães atendidos em clínicas particulares da cidade ou no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Cabe ressaltar que todas as coletas foram realizadas por uma veterinária, e seguindo todos os preceitos éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Os seguintes testes foram utilizados para o diagnóstico dos cães: DPP® e ELISA Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos.

Amostras de cães soropositivos e encaminhados pela Vigilância Epidemiológica de Lavras ao setor de Patologia Veterinária da UFLA para eutanásia também foram utilizadas no presente trabalho.

A soroteca utilizada no presente trabalho era composta de soros de 12 cães negativos e de 40 cães positivos pelo teste DPP® e ELISA Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos mantidos a temperatura de -20°C.

4.4 ELISA - rKDDR

Placas de ELISA de 96 *wells* (Costar®, EUA) foram sensibilizadas por 16 horas (*overnight*) a 4°C com 50ng de antígeno recombinante diluído em 100 µL de tampão carbonato [Na_2CO_3 15 mM (Synth, Brasil); NaHCO_3 34 mM (Merck, Brasil); pH ajustado em 9,6]. Após a sensibilização, as placas foram bloqueadas com 150 µL de PBS-Caseína (Merck, Alemanha) a 2%, pH = 7,4, durante 2 horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio das placas, 100 µL dos soros dos cães foram diluídos na proporção de 1:100 em PBS-Tween20 a 0,05% (pH = 7,4) e posteriormente adicionados aos poços e incubados por 12-16 horas (*overnight*) a 4°C. Em sequência, as placas foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (PBS- Tween20 a 0,05%). 100 µL do anticorpo anti-IgG canino com a enzima peroxidase (Sigma-Aldrich, USA), em diluição na proporção de 1:5000 (em PBS-Tween20 a 0,05%), adicionados em todos os poços e as placas foram então incubadas a 37°C por 1 hora e 30 minutos. As placas foram novamente lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (PBS-Tween20 a 0,05%), e em seguida adicionados 100 µL da solução reveladora (ácido cítrico 0,1 M; Na_2PO_4 0,2 M; OPD 0,05% e H_2O_2 0,1%) aos poços. As placas foram então incubadas a 37°C, ao abrigo de luz, por 10 minutos, quando a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de 4N H_2SO_4 diluído em água MilliQ. A absorbância resultante da reação foi mensurada em leitor de microplacas de ELISA com comprimento de onda de 492 nm. Para discriminar os animais em positivos e negativos no teste, os valores de absorbância obtidos foram comparados com o *Status* rKDDR, nos quais os valores iguais ou maiores ao *cut-off* (0,252) sendo

considerados positivos e valores menores ao *cut-off* foram considerados negativos.

4.5 Análise estatística

Para análise dos valores de absorbância, optou-se pela utilização dos dados em forma de proporção. Para comparação das proporções obtidas pelos três métodos de diagnóstico sorológico, utilizou-se Teste de Fisher (dados não paramétricos) e para os valores de carga parasitária dos tecidos analisados utilizou-se o Teste T (dados paramétricos) ao nível de $p < 0,05$ para valores significativos em ambos os testes. Para a análise de concordância entre os testes DPP®/ELISA Biomanguinhos e ELISA rKDDR, foi utilizado o teste Kappa, e os valores interpretados de acordo com a seguinte escala de Fleiss : 0,00-0,20, pobres; 0,21-0,40, justo; 0,41-0,60, moderada; 0,61-0,80, bom; 0,81-0,99, muito bom e 1,00, perfeito (FLEISS et al. 1972). Todas as análises foram feitas utilizando o software *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Inc, EUA) e o programa Microsoft Excel 2010 para o processamento e organização dos dados de absorbância gerados pelo ELISA rKDDR.

5 RESULTADOS

5.1 Confirmação do primeiro caso de LVC no município de Lavras – MG por *qPCR*.

A partir da utilização de amostras de medula óssea na *qPCR*, foram observados quatro cães positivos e cinco cães negativos, e para as amostras de baço, cinco cães positivos e quatro cães negativos, para a espécie *L. infantum*.

Estes cães representam os primeiros casos confirmados de infecção por *L. infantum*, parasito responsável pela LVC, através da *qPCR* no município de Lavras, Minas Gerais.

Os valores de frequência para animais positivos e negativos nas amostras de medula óssea foram de 45% e 55%, e nas amostras de baço, 55% e 45% respectivamente.

Foi construída a curva - padrão da DNA polimerase (Figura 1) a partir de uma regressão linear, na qual se encontrou o valor de 0,98 para R^2 , indicando assim um ajuste expressivo das variáveis como uma função linear. Esses valores indicam, além da presença do DNA do parasito nas amostras, que o log da quantidade de parasitos diminui nas amostras analisadas de acordo com o aumento do número de ciclos necessários para ultrapassar o limiar da fase exponencial de amplificação do material genético de *L. infantum*.

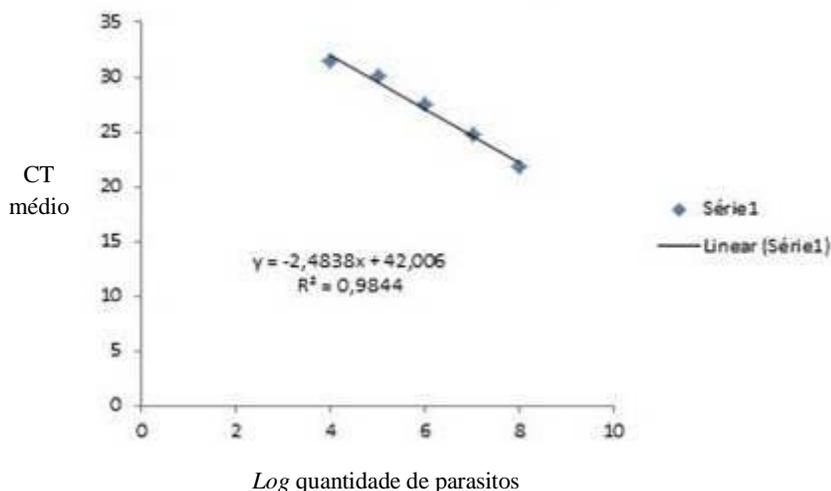


Figura 1. Curva-padrão da DNA polimerase de *Leishmania infantum* obtida nas amostras de medula óssea e baço através da *qPCR*.

Os valores de parasitos por miligrama de tecido para medula óssea e baço de cada cão, bem como a linha que representa a mediana podem ser observados graficamente na figura 2 abaixo.

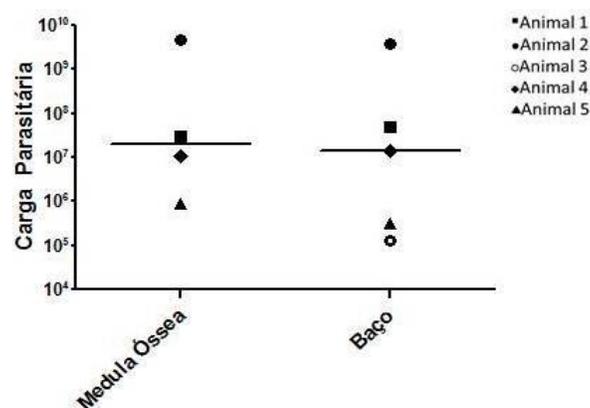


Figura 2. Carga parasitária de cães positivos para *Leishmania infantum* a partir de amostras de baço e medula óssea na qPCR.

Dos nove cães avaliados quatro foram positivos tanto em amostras de medula óssea como de baço, e um cão (animal 3) foi positivo apenas em sua amostra de medula óssea. A mediana da carga parasitária nas amostras de medula óssea foi de 2×10^6 parasitos/mg de tecido, e nas amostras de baço 14×10^6 parasitos/mg de tecido. Não houve diferença significativa para os valores de carga parasitária entre os dois tipos de tecido analisados (para valores de $p < 0,05$ significativos).

5.2 DPP®/ ELISA Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos e ELISA rKDDR

A partir da realização dos testes DPP®/ ELISA Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos no soro dos 52 cães foram observados 40 positivos e 12 negativos, e com relação às amostras submetidas ao teste ELISA rKDDR, foram observados 34 positivos e 18 negativos.

Os valores das frequências dos animais positivos e negativos no teste DPP®/ ELISA Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos foram de 75%

e 25% respectivamente, e para o teste ELISA rKDDR 65% e 35% das amostras, respectivamente.

Assumindo como valor de *cut-off* 0,252, a média da absorbância dos animais positivos para o teste ELISA rKDDR foi 1,705, e 0,100 para os animais negativos. O valor de concordância entre os dois testes assumiu um valor Kappa de 0,383, considerado “fair”, e o erro padrão um valor de 0,117. Através do teste de Fisher, o valor de *p* obtido foi de 0,033, o que indica que podemos observar uma diferença significativa entre os dois métodos de diagnóstico (para valores $p < 0,05$ significativos).

Dos 40 animais positivos nos testes DPP®/ ELISA Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos, nove apresentaram resultado negativo no teste ELISA rKDDR, e dos 12 negativos, três apresentaram resultado positivo.

6 DISCUSSÃO

O município de Lavras era considerado até o ano de 2013, de acordo com os critérios estabelecidos pelo Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (BRASIL, 2014), área silenciosa e não vulnerável para a leishmaniose visceral canina. Uma investigação preliminar demonstrou a ocorrência de cães com diagnóstico sorológico positivo para *Leishmania* spp. em diversos centros de atendimento veterinário do município, bem como resultados positivos em exames histopatológicos e parasitológicos no setor de Patologia Veterinária da UFLA, porém nenhum caso ainda havia sido notificado (dados não publicados). A partir da triagem de cães em um abrigo do município, utilizando os métodos de diagnóstico preconizados pelo Ministério da Saúde (teste imunocromatográfico DPP® e ELISA Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos) encontrou-se uma taxa de positividade para 20%, dos cães

avaliados (SANTOS et al., 2014). Flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* também foram encontrados em armadilhas dispostas em diferentes bairros do município e no campus da Universidade Federal de Lavras (BARCELOS et al., 2015). A partir destes estudos, verificou-se que Lavras se enquadra como área de transmissão de leishmaniose visceral, com presença de vetor e de casos autóctones da doença em cães, o que levou a realização de um inquérito sorológico no município, estudo epidemiológico preconizado pelo Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral que procede ao primeiro caso notificado da doença (BRASIL, 2014). No período de Setembro de 2014 a Junho de 2015, foram realizados 2.468 testes DPP®, sendo 2.228 cães (90,3%) negativos e 240 (9,7%) positivo. Destes 240 cães positivos, 72 (30%) foram negativos no ELISA Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos e 168 (70%) confirmaram o resultado do DPP® (ALVARENGA et al., 2015).

A fim de confirmar de forma específica a infecção por *L. infantum* nos cães de Lavras, amostras de baço e medula óssea foram coletadas de nove animais sabidamente positivos nos testes DPP® e ELISA Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos e submetidas posteriormente à PCR em tempo real - *q*PCR. Atualmente, esta técnica vem sendo utilizada por diversos autores para o diagnóstico ou monitoramento da evolução da LVC através da quantificação da carga parasitária, em substituição a outras técnicas, como por exemplo, à PCR convencional, pois apresenta altos valores de sensibilidade, precisão e reprodutibilidade (VITALE et al., 2004, MANNA et al., 2006). Nas amostras de medula óssea, observaram-se quatro cães positivos e cinco negativos, e para as amostras de baço, cinco cães positivos e quatro negativos. Os valores de frequência para animais positivos e negativos nas amostras de medula óssea foram de 45% e 55%, e nas amostras de baço, 55% e 45% respectivamente, e apenas quatro cães foram positivos tanto em amostras de medula óssea como de baço. Estes resultados diferem daqueles encontrados em trabalhos que utilizaram

qPCR em cães sorologicamente positivos, nos quais cerca de 100% dos animais apresentaram parasitos nos tecidos analisados (RAMOS, et al. 2013, REIS et al. 2013, MOHAMMADIHA et al. 2013). A diferença entre os resultados apresentados no presente trabalho e na literatura pode ter ocorrido devido variações no tecido utilizado, conforme observaram Solcà (2012) e Ramos (2013) em estudos prévios utilizando amostras de baço e medula óssea. Contudo, a confirmação da infecção por *L. infantum* realizada neste estudo é a primeira no município de Lavras, que contava até o presente momento apenas com cães diagnosticados como positivos através de ensaios sorológicos. Visto que o grau de reatividade cruzada nestes ensaios é alto devido à conservação proteômica entre as diferentes espécies de tripanossomatídeos, sua especificidade pode ser drasticamente reduzida devido a diferenças no material utilizado como antígeno para o teste (OLIVEIRA et al. 2008, ROMERO et al. 2009, ZANETTE et al. 2014).

Embora preconizado pelo Ministério da Saúde como teste oficial de triagem, ensaios imunocromatográficos em papel podem apresentar variações em seus valores de sensibilidade e especificidade (34,9% a 76,2% e 61,1% a 100%, respectivamente) (GRADONI et al. 2002, MANCIANTI et al. 2002, SCHALLIG et al., 2002a, REITHINGER et al., 2002b, COSTA et al. 2003, MOHEBALI et al. 2004, METTLER et al. 2005, OTRANTO et al. 2005, ROSYPAL et al. 2005, MAIA; CAMPINO, 2008), e conforme observaram Grimaldi e colaboradores (2012), o DPP® apresenta elevados valores de especificidade (96%), porém baixa sensibilidade (47%) na identificação de cães infectados e assintomáticos, e de forma contrária, sensibilidade significativamente maior (98%) em animais sintomáticos. Esta situação sugere que o DPP® possui resultados mais confiáveis apenas para cães que já manifestam a doença, podendo apresentar resultados falso-negativos em animais assintomáticos. O ELISA Leishmaniose Visceral Canina - Biomanguinhos é o

ensaio utilizado como confirmatório do DPP® e, embora possa ser utilizado em estudos epidemiológicos de larga escala, apresenta como agravante a possibilidade de reatividade cruzada com espécies de *Leishmania* spp. dermatóricas, conforme demonstrou De Jesus e colaboradores (2003) em um estudo realizado em área não endêmica para LVC no Pará, e pode por sua vez levar ao diagnóstico de cães falso-positivos.

Diante da necessidade de aprimoramento dos testes sorológicos utilizados pelo Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral e do desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, Lemos (2014) desenvolveu um novo antígeno recombinante, baseado na porção repetitiva de kinesina de *L. infantum*, que é solúvel, possui 8.5 motivos repetitivos de 39 aminoácidos e que foi denominado rKDDR. De forma a avaliar a resposta da rKDDR em testes a campo em uma diferente região endêmica para LVC, amostras de soro de 52 cães do município de Lavras foram submetidos ao teste ELISA com este novo antígeno. Após a realização do teste, foram observados 34 (65%) cães positivos e 18 (35%) cães negativos no ELISA rKDDR. Ensaios comparativos de reconhecimento sorológico canino comprovaram que a rKDDR quando comparada à rK39 possui maior sensibilidade (88,54% e 78,13 respectivamente) e especificidade (97,30% e 90,09% respectivamente), além do teste ELISA rKDDR apresentar melhor desempenho quando comparada com o teste ELISA Biomanguinhos, teste sorológico recomendado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico confirmatório da LVC (BRASIL, 2014).

Devido ao elevado número de amostras consideradas negativas pela ELISA rKDDR apresentarem-se positivas nos testes DPP® e ELISA Leishmaniose Visceral Canina - Biomanguinhos, faz-se necessário uma avaliação mais detalhada desse material, como por exemplo título de anticorpos, qPCR tanto para *Leishmania* spp. como para outros parasitos, verificação da possibilidade de reatividade cruzada com outras espécies de parasitos tais como

Babesia canis, *Ehrlichia canis*, *Rangelia vitalli* e *Trypanosoma cruzi* nos resultados dos testes DPP® e ELISA Biomanguinhos entre outros testes, de forma a analisar quais as possíveis variáveis envolvidas que levaram a estes resultados. Devido a importância da pesquisa de novos ensaios, a utilização de um novo antígeno como a rKDDR abre perspectivas para o desenvolvimento tecnológico direcionado ao aperfeiçoamento e implementação de novos testes rápidos, práticos e de baixo custo, tanto para o diagnóstico da leishmaniose humana como da LVC (LEMOS, 2014).

7 CONCLUSÕES

- Através dos resultados obtidos neste projeto foi possível confirmar, através da *q*PCR, o primeiro caso de infecção canina pela espécie *Leishmania infantum* no município de Lavras-MG.
- Para que se possa avaliar de forma mais precisa a eficácia da técnica ELISA rKDDR para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em Lavras – MG, novos dados devem ser adicionados ao presente projeto, tais como aqueles derivados de diagnóstico parasitológico e molecular de cães que tiverem amostras de soro analisadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAR, J. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ALVARENGA, I. M. et al. Avaliação dos resultados obtidos a partir da realização dos exames de DPP® e ELISA em cães de uma área endêmica para leishmaniose visceral canina. **Anais do XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia (XXIV CBP) e do XXIII Congresso Latinoamericano de Parasitologia – CLP/FLAP**, 2015, Salvador. 1 CD ROM

BALEEIRO, C. O. et al. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic area. **Vet. Parasitol.**, v. 139, p. 21-28, 2006.

BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol.**, v. 24, p.324–330, 2008.

BARCELOS, A. L. et al. Fauna flebotômica do município de Lavras, Minas Gerais, Brasil: dados preliminares. **Anais do XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia (XXIV CBP) e do XXIII Congresso Latinoamericano de Parasitologia – CLP/FLAP**, 2015, Salvador. 1 CD ROM.

BLAVIER, A. et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. **Vet. J.**, v. 162, p. 108–120, 2001.

BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J. P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. **J.Vet. Diag. Inv.**, v. 2, n. 9, p. 439-440, 1997b.

BOSSOLASCO, S. et al. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5080–5084, 2003.

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

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota técnica conjunta nº 01/2011. **CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS-MS**, Brasília, 3 p., 2011.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**, Brasília/DF, 120 p., 2014.

BRITO, M. E. et al. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 7, p. 318–321, 2000.

COSTA, R., et al. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, p. 678–682, 2003.

CUNHA, A. M., CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* n.sp. Nota prévia. **Hospital (Rio J)**, v. 11, p. 3-9, 1937.

DANTAS-TORRES, F., BRANDÃO-FILHO, S. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Final comments on an interesting taxonomic dilemma: *Leishmania infantum* versus *Leishmania infantum chagasi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 929-930, 2006b.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasit. Vec.**, v. 2, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitol.**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

DE ARAÚJO, V. E. M. et al. Relative Risk of Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Spatial Analysis in Urban Area. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 11, 2013.

DE JESUS, R. C. S., et al. Comparação das técnicas de RIFI (ag. IEC x ag. BIO-Manguinhos) e ELISA no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC), Estado do Pará, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 311, 2003.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clin. Dermatol.**, v. 14, n. 5, p. 417 – 423, 1996.

FERROGLIO, E. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and western blot. **Vet. Parasitol.**, v. 144, p. 162–166, 2007.

FUNED. Manual do Programa de Avaliação da Qualidade Imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. **Serviço de Doenças Parasitárias**, 2013.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, 2004.

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: **Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum**, Intervet International bv, Sevilla, Spain, p. 7–14, 2002.

GRIMALDI, G., SCHOTTELIUS, J. Leishmaniasis-Their relationships to monoxenous and dixenous trypanosomatids. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 190, p. 3-8, 2001.

GRIMALDI, G., et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 106, n. 54, p. 9, 2012.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.

JERONIMO, S. M. B., et al. Natural History of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: Long-Term Follow-Up. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 608–609, 2000.

KHADEM VATAN, S. et al. Diagnosis and identification of *Leishmania* spp. from giemsa-stained slides, by real-time PCR and melting curve analysis in south-west of Iran, **Annals Trop. Med. Parasitol.**, v. 105, n. 8, p. 559–565, 2011.

KUBISTA, M. The real-time polymerase chain reaction. **Mol. Asp. Med.**, v. 27, p. 95-125, 2006.

LAINSON, R., SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. **Nature**, v. 22, n. 273, p. 595-600, 1978.

LAINSON, R., RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LEMOS, L. C. D. **Expressão heteróloga da rKDDR de *Leishmania infantum*: um novo antígeno recombinante para o diagnóstico da leishmaniose visceral**. 2014. 104 p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

LUTZ, A., NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 4, p. 84-95, 1912.

MAGALHAES, P. A. et al. Kala-azar in the Rio Doce, Minas Gerais area. Results of prophylactic measures. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 22, p. 197-202, 1980.

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

MALLA, N., MAHAJAN, R. C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, p. 267-274, 2006.

MANCIANTI, F., TARDONI, S., MELOSI, M. Evaluation of the effectiveness of commercial immunomigration tests in the diagnosis of canine leishmaniasis. **Parasitol.**, v. 44, n. 99, 2002.

MANNA, L. et al. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Vet. Parasit.**, New York, v. 142, p. 271-280, 2006.

MANNA, L. et al. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Res. in Vet. Sci.**, n. 1, p. 76-78, 2009.

MEREDITH, S. et al. Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1742-1745, 1995.

METTLER, M., et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, in immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and

asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 5515–5519, 2005.

MICHALSKY, E. M. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 44, p. 255–259, 2002.

MOHAMMADIHA, A. et al. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. **Exp. Parasitol.**, v. 133, p. 89–94, 2013.

MOHEBALI, M., TARAN, M., ZAREI, Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. **Vet. Parasitol.**, v. 121, p. 239–245, 2004.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de *Leishmania* (ou organisms voisins) du gondi. **Acad. Sci.**, v. 146, p. 207–209, 1908.

OLIVA, G., et al. 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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 1318–1322, 2006.

OLIVEIRA, T. M. F. S. et al. 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. **Rev. Bras. Parasit. Vet.**, v. 17, n. 1, p. 7–11, 2008.

OTRANTO, D. Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 17, p. 32–37, 2005.

QUARESMA, P. F. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta. Trop.**, v. 111, n. 3, p. 289–294, 2009.

QUINNELL, R. J. et al. Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 1, p. 1992, 2013.

RAMOS, R. A. N. et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in the bone marrow, lymph node and spleen of dogs. **Rev. Bras. Parasit. Vet.**, v. 22, n. 3, p. 346- 350, 2013.

RIBEIRO, V. M. et al. Evaluation of the potential transmission of visceral leishmaniasis in a canine shelter. **Revue Méd. Vét.**,v. 156, p. 20-22, 2005.

REIS, L. E. S. **Detecção de *Leishmania* por PCR e suas variações (seminested PCR e PCR em tempo real), em fragmentos de pele e de baço de cães com leishmaniose visceral.** 2013. 85 p. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Ouro Preto, 2013.

REITHINGER, R., et al. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzymelinked immunosorbent assay, and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 2352–2356, 2002b.

ROMERO, H. D. et al. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 27-33, 2009.

ROSÁRIO, E. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 197–203, 2005.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **Brit. Med. J.**, v. 2, n. 2237, p. 1261-1262, 1903.

ROSYPAL, A. Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania infantum infantum*. **J. Vet. Inter. Med.** v. 19, p. 802–809, 2005.

SACKS, D., KAMHAWI, S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. **Ann. Review of Microbiol.**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SANTOS, M. J. B. M et al. Inquérito sorológico para leishmaniose visceral canina no município de Lavras-MG: dados preliminares. **Anais do VXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA**, 2014, Gramado. 1 CD ROM.

SCHALLIG, H. D. F. H., OSKAM, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Trop. Med. Intern. Health**, v. 7, p. 641-651, 2002a.

SCHALLIG, H. D., CANTO-CAVALHEIRO, M., DA SILVA, E.S. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1015-1018, 2002b.

SCHLEIN, Y. *Leishmania* and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitol. Today**, v. 9, n. 7, p. 255-258, 1993.

SOLANO-GALLEGO L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum* infected dogs. **J. Comp. Pathol.**, v. 130, n. 1, p. 7-12, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasit. Vec.**, v. 86, e. 4, 2011.

SOLCÀ, M. da S. **Uso de PCR no diagnóstico da leishmaniose visceral canina: uma abordagem comparativa de diferentes protocolos e tecidos.** 2012. 88 p. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal da Bahia, 2012.

SRIVASTAVA, P. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 105, n. 1, p. 1-6, 2011.

SUNDAR, S., RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **J. Immun. Met.**, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

VITALE, F. et al. TaqMan-Based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1026, n. 1, p. 139-143, 2004.

XAVIER, S. C. et al. Comparison of paraffin – embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Vet. Res.**, v. 2, n. 17, p. 1-7, 2006.

YOUNG D. G., ARIAS J. R. Flebotomos: Vectores de Leishmaniasis en las Americas. **Org. Pan. Salud.**, Caderno técnico, e. 33, 1992.

WEIRATHER, J. L. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, p. 3892–3904, 2011.

ZANETTE, M. F. et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 47, p. 105- 107, 2014.