



CAROLINA NOVATO GONDIM

**DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA EM UMA ÁREA DE
TRANSMISSÃO RECENTE: MAIS DE 25% DOS
CÃES SORONEGATIVOS ESTAVAM
INFECTADOS**

LAVRAS – MG

2019

CAROLINA NOVATO GONDIM

**DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM UMA
ÁREA DE TRANSMISSÃO RECENTE: MAIS DE 25% DOS CÃES
SORONEGATIVOS ESTAVAM INFECTADOS**

Dissertação de mestrado apresentada à banca avaliadora como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Lavras, para obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante

Orientadora

Prof. Dr. Sidney de Almeida Ferreira

Coorientador

LAVRAS - MG

2019

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

Gondim, Carolina Novato.

Diagnóstico da Leishmaniose Visceral canina em uma área de transmissão recente: mais de 25% dos cães soronegativos estavam infectados / Carolina Novato Gondim. - 2019.

103 p. : il.

Orientador(a): Joziana Muniz de Paiva Barçante.

Coorientador(a): Sidney de Almeida Ferreira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Leishmania infantum. 2. Teste rápido. 3. PCR. I. Barçante, Joziana Muniz de Paiva. II. Ferreira, Sidney de Almeida. III. Título.

CAROLINA NOVATO GONDIM

**DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM UMA
ÁREA DE TRANSMISSÃO RECENTE: MAIS DE 25% DOS CÃES
SORONEGATIVOS ESTAVAM INFECTADOS**

Dissertação de mestrado apresentada à banca avaliadora como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Lavras, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em: 30/04/2019.

Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante	UFLA
Dra. Mariana Santos Cardoso	UFMG
Dr. Vitor Márcio Ribeiro	PUC

LAVRAS - MG

2019

Aos meus pais, Niêde e Gusmão, por me ensinarem através do exemplo que o estudo sempre foi o melhor caminho para aprimoramento do ser humano.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Durante os dois anos de mestrado tive auxílio técnico e apoio moral de várias pessoas que foram fundamentais para que este trabalho fosse concretizado. Assim, quero deixar expresso os meus mais sinceros agradecimentos àqueles que enriqueceram e contribuíram ao longo dessa jornada.

Aos meus pais, Niêde e Gusmão, pelo exemplo, apoio incondicional e por nunca medirem esforços para sempre priorizar o estudo em minha caminhada.

Aos meus irmãos, Hugo, Túlio e Paula que além de serem meus melhores amigos, sempre me incentivaram na continuação dos estudos e me servem de espelho, refletindo a imagem que almejo alcançar.

Ao meu namorado, amigo, confidente, parceiro, Lucas, pelo companheirismo e paciência nos dias estressantes, por sempre acreditar no meu potencial e por ser um exemplo pra mim, de determinação e coragem, e que assim como eu, acredita não existir crescimento no comodismo.

Aos meus amados avós, às minhas cunhadas e cunhado, meu sobrinho iluminado, tios, primos e todos familiares por representarem meu porto seguro, meu alento para seguir em frente.

À minha orientadora, Jozi, pelo exemplo de profissional e pesquisadora, que me fez enxergar a pesquisa com outros olhos, voltados aos anseios da população e a não deixar de lado o cunho social nos objetivos de nossos estudos.

Ao meu coorientador, Sidney, pelo auxílio técnico na tão complexa biologia molecular, assim como em toda a dissertação.

Aos colegas do Núcleo de Estudos em Parasitologia, pelo compartilhamento de aprendizado, em especial à Bia Vasconcelos, Jucilene, Bia Mendonça, Ingrid e Leandro, pela ajuda nas execuções técnicas do projeto.

Ao professor Flademir pela gentileza no fornecimento de amostras do setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

À professora Elaine pelas dicas na parte estatística.

Ao professor Thales pelas contribuições na qualificação.

À técnica Vanessa pelo auxílio nos experimentos no Laboratório de Biologia Parasitária da UFLA.

À coordenação do Hospital Veterinário da UFLA, e toda a sua equipe de trabalho, em especial aos residentes da Clínica de Pequenos Animais, que foram fundamentais em todo o processo de abordagem e coleta das amostras caninas, atuando com todo o respeito e ética que nossos pacientes de quatro patas merecem ter.

Ao professor Ricardo Fujiwara da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela gentil parceria, que viabilizou grande parte dos materiais, estrutura e equipamentos para o desenvolvimento da pesquisa.

À toda a equipe do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em especial à Josinha, Michele e Williane, pelo apoio técnico e treinamentos.

Aos tutores e aos cães que participaram da pesquisa.

Aos meus colegas da primeira turma do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFLA, pela amizade, compartilhamento de conhecimento e pelos momentos de descontração e muitas risadas.

À Prefeitura Municipal de Lavras pelo fornecimento de material técnico.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFLA pela oportunidade e a todos os professores pelo ensino de qualidade.

“Ontem eu era...

Hoje já não sou mais!

*Exatamente por que hoje, eu sou
mais do que antes era.*

*(...) Não, não carrego nada
nessa bagagem, ao contrário,
por onde ando, deixo um pouco
daquilo que até então eu não
tinha (...)*”

(Flávio Samadhi)

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é uma doença parasitária que tem o cão como principal reservatório doméstico no meio urbano e é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, sendo considerada uma das mais importantes zoonoses no contexto da saúde pública. Nas últimas décadas, tem-se observado a crescente expansão e urbanização da LVA no Brasil e o município de Lavras/MG é uma nova área de investigação epidemiológica. O Ministério da Saúde preconiza a utilização do teste rápido (TR) DPP® para triagem diagnóstica da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), sendo os casos positivos confirmados pelo ensaio imunoenzimático (EIE) da Bio-Manguinhos. Porém, pesquisas demonstram uma baixa sensibilidade do TR DPP® em cães sem sinais clínicos. Diante do exposto, o presente estudo transversal teve por objetivo analisar o desempenho de diferentes metodologias utilizadas no diagnóstico da LVC, utilizando testes parasitológicos e moleculares como padrão de referência em cães amostrados do município de Lavras e cidades circunvizinhas, segregados pelo quadro clínico. A amostra foi composta por 52 cães separados em grupos com ausência e presença de sinais clínicos da LVC. Foram realizadas as técnicas: TR DPP® com sangue total colhido pela ponta da orelha e com sangue venoso; TR ALERE®, TR e EIE com a proteína rKDDR-plus; parasitológico direto do aspirado de medula óssea; PCR da amostra colhida com “swab” conjuntival e da medula óssea. Os valores de sensibilidade obtidos em cães com sinais clínicos presentes e ausentes foram respectivamente: TR DPP® ponta de orelha (93 e 47%); TR DPP® sangue venoso (93 e 52%); TR ALERE® (79 e 42%); TR rKDDR-plus (86 e 52%); EIE rKDDR-plus (86 e 57%); parasitológico direto medula óssea (20 e 9%); PCR “swab” conjuntival (94 e 87%); PCR medula óssea (100 e 90%). Os valores da especificidade não puderam ser avaliados pelo baixo número de verdadeiros negativos na amostra. Concluiu-se que mais de 25% dos cães soronegativos estão infectados e os testes sorológicos apresentaram resultados insatisfatórios de sensibilidade nos cães sem sinais clínicos para serem enquadrados como testes de triagem. Sugere-se que a PCR com “swab” conjuntival seja utilizada como teste de triagem em cães sem sinais clínicos por ser uma técnica de coleta não invasiva e que apresenta elevados valores de sensibilidade.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*; Teste rápido; PCR; Zoonose.

ABSTRACT

American Visceral Leishmaniasis (AVL) is a parasitic disease that has the dog as the main domestic reservoir and is caused by the protozoan *Leishmania infantum*, being considered one of the most important zoonosis in the context of public health. In the last decades, the increasing expansion and urbanization of LVA in Brazil has been observed and the municipality of Lavras / MG is a new area of epidemiological investigation. The Ministry of Health recommends the use of the quick test (TR) DPP® for diagnostic screening of Canine Visceral Leishmaniasis (LVC), and the positive cases are confirmed by Bio-Manguinhos enzyme immunoassay (EIE). However, research shows a low sensitivity of TR DPP® in dogs without clinical signs. In view of the above, this cross - sectional study aimed to analyze the performance of different methodologies used in the diagnosis of LVC, using parasitological and molecular tests as a reference standard; in dogs sampled from the municipality of Lavras and surrounding cities, segregated by the clinical condition. The sample consisted of 52 dogs separated into groups with absence and presence of clinical signs of LVC. The following techniques were performed: TR DPP® with whole blood collected by the tip of the ear and with venous blood; TR ALERE®, TR and EIE with the rKDDR-plus protein; direct parasitological aspiration of bone marrow; PCR of the sample collected with conjunctival swab and bone marrow. The sensitivity values obtained in dogs with clinical signs present and absent were respectively: TR DPP® ear tip (93 and 47%); TR DPP® venous blood (93 and 52%); TR ALERE® (79 and 42%); TR rKDDR-plus (86 and 52%); EIE rKDDR-plus (86 and 57%); direct parasitological bone marrow (20 and 9%); Conjunctival swab PCR (94 and 87%); Bone marrow PCR (100 and 90%). The specificity values could not be evaluated because the true negatives in the sample were lower. It was concluded that more than 25% of the negative serum dogs are infected and the serological tests presented unsatisfactory results of sensitivity in dogs without clinical signs to be classified as screening tests. It is suggested that PCR with conjunctival swab should be used as a screening test in dogs without clinical signs because it is a non-invasive collection technique and presents high sensitivity values.

Keywords: *Leishmania infantum*; Quick test; PCR; Zoonosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Manifestações clínicas em cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i>	24
Figura 2 - Casos de Leishmaniose Visceral Humana por unidade de federação no Brasil no ano de 2017.....	25
Figura 3 - Casos de infecção por Leishmaniose Visceral Humana por município, Brasil no ano de 2017.....	26
Figura 4 -Teste imunocromatográfico rápido DPP®, Bio-Manguinhos. Resultado reagente e não-reagente para detecção de anticorpos contra <i>L. infantum</i> , utilizando amostra de sangue venoso.....	29
Figura 5 - Localização do município de Lavras, MG e as cidades circunvizinhas onde foram obtidos cães para composição da amostra.....	36
Figura 6 - Fluxograma dos procedimentos realizados.....	38
Figura 7 - Componentes do teste imunocromatográfico de fluxo lateral.....	43
Figura 8 - Teste rápido imunocromatográfico com Ag rKDDR-plus.....	44
Figura 9 - Distribuição de frequência do escore clínico obtido entre os dois grupos amostrais.....	52
Figura 10 - Frequência absoluta de sinais clínicos sugestivos de Leishmaniose Visceral Canina observados em cães residentes no município de Lavras, Minas Gerais, no período de agosto de 2018 a janeiro de 2019.....	53
Figura 11 - Distribuição geográfica dos cães alvos de estudo no município de Lavras, MG.....	55
Figura 12 - Resultados representativos do teste parasitológico direto utilizando aspirados medulares.....	58
Figura 13 - Resultados da PCR convencional para as amostras de medula óssea e “swab” conjuntival de cães amostrados.....	59

Figura 14 - Distribuição de frequência e ponto de corte (A) e curva ROC (B) do EIE com o antígeno rKDDR-plus.....	64
Figura 15 - Análise de RFLP de amplicons referentes a amostras de medula óssea e “swab” conjuntival de cães procedentes do município de Lavras, MG e cidades circunvizinhas, durante o período de agosto de 2018 a janeiro de 2019.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de escore padronizados para sinais clínicos relacionados à LVC e classificação quanto à pontuação final.	42
Tabela 2 - Iniciadores usados nas reações de PCR com suas respectivas sequências e tamanhos de produtos amplificados.	47
Tabela 3 - Relação entre os valores de kappa e a força de concordância	49
Tabela 4 - Caracterização da população de cães submetidos a diferentes procedimentos metodológicos, para diagnóstico da Leishmaniose Visceral, em uma área de transmissão recente, no município de Lavras, Minas Gerais, no período de agosto de 2018 a janeiro de 2019.....	51
Tabela 5 - Frequência de medidas profiláticas em relação à Leishmaniose Visceral Canina, adotadas por proprietários/tutores e hábitos de cães provenientes do município de Lavras, Minas Gerais, no período de agosto de 2018 a janeiro	54
Tabela 6 - Resultado das técnicas realizadas nos cães amostrados no município de Lavras e cidades circunvizinhas.....	56
Tabela 7 - Parâmetros para avaliação do TR DPP® para detecção de anticorpos contra <i>Leishmania infantum</i> com coleta em diferentes sítios anatômicos, em 52 cães do município de Lavras e cidades circunvizinhas.....	62
Tabela 8 - Concordância e análise de frequência de positividade do TR DPP® para detecção de anticorpos contra <i>Leishmania infantum</i> , com coleta em diferentes sítios anatômicos, em 52 cães do município de Lavras e cidades circunvizinhas, em comparação ao padrão de referência.....	63
Tabela 9 - Parâmetros para avaliação da proteína rKDDR-plus para detecção de anticorpos contra <i>Leishmania infantum</i> por técnica	

imunocromatográfica e EIE em 52 cães do município de Lavras e cidades circunvizinhas.....	64
Tabela 10 - Parâmetros para avaliação do desempenho de várias técnicas para diagnóstico da Leishmaniose Visceral em 52 cães do município de Lavras e cidades circunvizinhas.....	66
Tabela 11 - Concordância e análise de frequência de positividade entre os testes para diagnóstico da LVC e o padrão de referência.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag - Antígeno
ALT- Alanina amino transferase
ASC- Ausência de sinais clínicos
AST - Aspartato amino transferase
AUC- Área sob a curva
CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária
DNA - Ácido desoxirribonucléico
DPP® - “Dual path platform”
EIE - Ensaio imunoenzimático
ELISA - “Enzyme Linked Immuno no Sorbent Assay”
FUNED- Fundação Ezequiel Dias
GGT - Gama glutamil transferase
HIV - “Human Immunodeficiency Virus”
ITS1- “Internal Transcribed Spacer 1”
LV - Leishmaniose Visceral
LVC- Leishmaniose Visceral Canina
LVH - Leishmaniose Visceral Humana
MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MG - Minas Gerais
MS - Ministério da Saúde
OMS - Organização Mundial da Saúde
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PSC- Presença de sinais clínicos
RIFI - Reação da imunofluorescência indireta
rKDDR - “Kinesin Degenerated Derived Repeat”
ROC - “Receiver operator curve”

STARD - “Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy”

STROBE - “Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology”

TR- Teste rápido

UFLA - Universidade Federal de Lavras

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Aspectos gerais da leishmaniose visceral	20
2.2	Quadro clínico e alterações laboratoriais complementares	23
2.3	Epidemiologia.....	25
2.4	Diagnóstico laboratorial da Leishmaniose Visceral Canina.....	27
2.4.1	Técnicas parasitológicas	27
2.4.2	Técnicas sorológicas.....	28
2.4.3	Técnicas de biologia molecular	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo Geral.....	33
3.2	Objetivos Específicos	33
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1	Aspectos éticos.....	34
4.2	Área de estudo.....	34
4.3	Tipo de estudo	35
4.4	Critérios de seleção da amostra	35
4.5	Fluxograma dos procedimentos realizados	37
4.5.1	Coleta de dados e amostras biológicas	39
4.5.1.1	Anamnese.....	39
4.5.1.2	Coleta de sangue total por lanceta.....	39
4.5.1.3	Coleta de sangue venoso.....	39
4.5.1.4	Coleta de células da mucosa conjuntival.....	39
4.5.1.5	Punção da medula óssea.....	40
4.5.2	Avaliação clínica.....	41
4.5.3	Realização de testes imunocromatográficos.....	42
4.5.4	Ensaio imunoenzimático com antígeno rKDDR-plus.....	44

4.5.5	Parasitológico direto da punção de medula óssea.....	45
4.5.6	Extração de DNA.....	46
4.5.7	PCR convencional.....	47
4.5.8	Identificação de espécie pelo polimorfismo de fragmentos de DNA (RFLP).....	48
4.6	Padrão de referência.....	49
4.7	Análise de dados e análise estatística.....	49
5	RESULTADOS.....	51
5.1	Características e informações adquiridas pela anamnese.....	51
5.2	Resultados laboratoriais.....	56
5.2.1	Avaliação da concordância de resultados do TR-DPP® a partir de amostras de diferentes sítios anatômicos do cão.....	61
5.2.2	Avaliação do desempenho da proteína rKDRR-plus.....	63
5.2.3	Análise do desempenho e concordância de resultados entre técnicas imunocromatográficas, imunoenzimáticas, parasitológicas e moleculares.....	65
5.2.4	Identificação da espécie de <i>Leishmania</i>	68
5.3	Primeiros casos notificados de LVC no município de Nepomuceno/MG.....	69
6	DISCUSSÃO.....	72
7	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS.....	85
	APÊNDICE A - Termo de autorização.....	94
	APÊNDICE B – Características e dados dos cães amostrados.....	95
	APÊNDICE C - Resultados laboratoriais.....	99
	ANEXO A – Itens essenciais adotados segundo a declaração STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology), 2007.....	101

ANEXO B – Itens essenciais adotados pela iniciativa STARD (Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy), 2015.....	103
--	------------

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é doença parasitária considerada uma das mais importantes zoonoses e é uma das nove doenças prioritárias pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em função da elevada morbimortalidade e da importância no contexto da saúde única uma vez que acomete, sobretudo, seres humanos e cães domésticos.

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde (MS), cães positivos devem ser eutanasiados ou submetidos a tratamento específico. O tratamento autorizado é baseado no uso da miltefosina com acompanhamento médico-veterinário permanente. Em função de ser um fármaco importado, o custo do tratamento ainda possui elevado custo. Adicionalmente, ainda não existe evidência científica que demonstre cura parasitológica do animal tratado, embora os sinais clínicos sejam significativamente reduzidos.

Considerando os dois desfechos possíveis, é essencial que o diagnóstico dos animais seja assertivo e testes com elevada acurácia assumem papel crucial para evitar a eutanásia ou tratamento de animais falsos positivos, assim como evitar que animais falsos negativos sejam privados de tratamento e perpetuem o ciclo biológico do parasito.

Além do tratamento, a epidemiologia e medidas preventivas como a vacinação do cão em áreas enzoóticas, dependem de um correto diagnóstico. Porém, trabalhos realizados em diferentes regiões do Brasil têm demonstrado variações na sensibilidade e especificidade dos testes empregados no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) (LAURENTI et al, 2014; PEIXOTO, OLIVEIRA, ROMERO, 2015).

O teste rápido (TR) DPP® é utilizado em inquéritos epidemiológicos pelos órgãos de vigilância ambiental para obtenção de um resultado rápido de triagem visando o diagnóstico da LVC. Na falta da disponibilidade do TR DPP®

ao município, o TR da marca ALERE® é recomendado (FUNED, 2015). Ambos são compostos por proteínas recombinantes K28, derivadas de proteínas da família kinesina que possuem elevado potencial imunogênico. No entanto, estudos vêm demonstrando uma baixa sensibilidade do DPP® em cães clinicamente assintomáticos (GRIMALDI et al, 2012; LOPES et al, 2017).

Em 2014, foi desenvolvida uma proteína recombinante, a rKDDR (“Kinesin Degenerated Derived Repeat”) que possui a sua versão otimizada constituída por cerca de 15 motivos repetitivos de 39 aminoácidos da proteína kinesina. TR e ensaio imunoenzimático (EIE) com a proteína rKDDR-plus foram avaliados em ensaios de desempenho sorológico, apresentando resultados insatisfatórios de sensibilidade para a técnica imunocromatográfica (SIQUEIRA, 2018).

O município de Lavras/MG começou a registrar casos de LVC no final do ano de 2013 e Leishmaniose Visceral Humana (LVH) em 2017 e está enquadrado como área de transmissão recente (BRASIL, 2016a; LAVRAS, 2019). Nosso grupo de pesquisa vem realizando investigações epidemiológicas acerca dos vetores, casos humanos e caninos. Em 2014, iniciaram-se as avaliações do desempenho da proteína rKDDR, precursora da rKDDR-plus pelo EIE em cães do município. No entanto, concluiu-se que novas técnicas como as moleculares e parasitológicas deveriam ser adicionadas ao projeto para uma avaliação mais precisa (NARCISO, 2016).

Dando continuidade às pesquisas anteriores desenvolvidas pelo nosso grupo, este trabalho visa avaliar a eficácia de diferentes métodos de diagnóstico laboratorial da LVC com as proteínas rK28 e rKDDR-plus, utilizando testes moleculares e parasitológicos como padrão de referência em amostras caninas segregadas pela presença ou ausência de sinais clínicos no município de Lavras.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral

A LV possui como agente etiológico, parasitos do gênero *Leishmania*. Este gênero se subdivide em dois subgêneros, *Viannia* que engloba espécies responsáveis pela Leishmaniose Tegumentar e o subgênero *Leishmania* que corresponde às espécies responsáveis pela visceralização da doença, assim como outras espécies causadoras da forma cutânea (LAINSON; SHAW, 1978; SRIVASTAVA et al., 2011). As espécies causadoras da forma visceral são *Leishmania Leishmania donovani*, localizadas na Índia, oriente africano, Bangladesh e Nepal e *L. (L.) infantum*, nas Américas, Europa, África, China e no Oriente Médio (LUKES et al., 2007).

A LV é classificada pela OMS como uma doença negligenciada, acometendo principalmente a população de países sub-desenvolvidos e em desenvolvimento. Conhecida como calazar, é a forma mais grave dos tipos de leishmaniose, sendo letal em mais de 95% dos casos se não tratada adequadamente (WHO, 2018). O protozoário causador de LV pode infectar diversas espécies de mamíferos, incluindo os humanos, e o cão doméstico é o reservatório animal de maior importância epidemiológica no ambiente urbano (DANTAS-TORRES, 2007).

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é uma doença cujo agente etiológico é transmitido por um inseto vetor, quando formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum* passam ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos. No Brasil, *Lutzomyia longipalpis* é considerada a principal espécie de flebotomíneo associada ao ciclo de transmissão (LAINSON; RANGEL 2005). Contudo, em algumas regiões livres de *L. longipalpis*, as espécies *L. cruzi*, *L. (Pintomyia) fischeri* e *L. migonei* já

foram reportadas com vetoras (GUIMARÃES et al., 2016; OVALLOS, 2011; SANTOS et al., 2018).

Os vetores possuem hábitos crepusculares e noturnos, sendo encontrados em ambientes de matas e florestas com a presença de matéria orgânica. No passado, a LV possuía um caráter essencialmente silvestre. Contudo, desde a década de 80, tem-se verificado um processo claro de expansão e urbanização relacionada às mudanças ambientais, migração de reservatórios e adaptação de flebotomíneos em áreas peri-domiciliares (HARHAY et al., 2011).

O ciclo biológico do parasito é digenético ocorrendo no vetor a partir da ingestão da forma amastigota durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado. Após a multiplicação, se diferenciam em formas promastigotas e posteriormente transformam-se em promastigotas metacíclicas que são repassadas a um hospedeiro mamífero no próximo repasto sanguíneo. Nos mamíferos, os parasitos inoculados são fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear, tendo os macrófagos papel fundamental no processo de infecção (BATES, 2007). As amastigotas, em sua maioria, são resistentes à digestão fagolisossômica e conseguem se replicar nos macrófagos. Consequentemente, mais macrófagos se tornam progressivamente infectados e são destruídos (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004).

As medidas preventivas voltadas à população humana incluem ações para evitar a exposição ao flebotomíneo, como o uso de inseticidas repelentes a base de piretróides e utilização de telas específicas também impregnadas com inseticidas piretróides em janelas. O manejo ambiental através da limpeza urbana, limpeza de quintais, terrenos e praças públicas, destinação adequada de resíduos sólidos orgânicos, são medidas que visam diminuir as condições favoráveis ao estabelecimento de criadouros do vetor. As medidas voltadas à população canina incluem o controle de cães errantes, controle de doação de cães de área endêmica para outras localidades não endêmicas, vacinação, uso de

telas impregnadas com inseticidas piretróides em canis e coleiras impregnadas com deltametrina a 4%, flumetrina 4,5% e uso tópico de cipermetrina (BRASIL, 2014).

Já as medidas de controle adotadas pelas políticas públicas estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, redução dos vetores através de controle químico que vai variar de acordo com a classificação epidemiológica do município, atividades de educação em saúde e eliminação dos reservatórios através da eutanásia de todos os animais sororreagentes e/ou parasitológico positivos (BRASIL, 2014). Esta última medida gera opiniões controversas de várias entidades de proteção animal e pesquisadores, diante de estudos que abordam evidências científicas que demonstraram a sua baixa efetividade (COURTENAY et al., 2002; MOREIRA et al., 2004; MACHADO; SILVA; VILANI, 2016). A partir de 2016 o primeiro fármaco (miltefosina) foi registrado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o tratamento de cães com LVC, visto que o tratamento com produtos de uso humano ou não registrados no MAPA é proibido. Como a miltefosina não é uma droga utilizada para o tratamento da doença em humanos no Brasil, por não ter apresentado eficácia para ser incorporada no protocolo terapêutico, o tratamento de cães com LVC com o referido medicamento passou a ser uma possibilidade legal. Assim, apesar do tratamento de cães com LVC não se configurar como uma medida de saúde pública para controle da doença, cabe ao tutor do animal a decisão de optar pela eutanásia ou pelo tratamento, desde que assistido por um médico veterinário e que a miltefosina esteja incorporada ao tratamento (BRASIL, 2016c).

2.2 Quadro clínico e alterações laboratoriais complementares

O quadro clínico típico da LVH inclui febre, palidez cutâneo-mucosa, perda de peso, hepatoesplenomegalia, hemorragias, icterícia e ascite (MURRAY et al., 2005). Alterações laboratoriais frequentes correspondem a hiperglobulinemia, velocidade de hemossedimentação alta e pancitopenia resultante da multiplicação de amastigotas em macrófagos, principalmente no fígado e órgãos linfoides, como linfonodo, baço e medula óssea, causando lesões graves. As alterações bioquímicas podem estar presentes e incluem elevação dos níveis das aminotransferases, bilirrubinas e aumento discreto dos níveis de uréia e creatinina (BRASIL, 2014). O envolvimento de órgãos atípicos, como os pulmões ou sistema gastrointestinal e insuficiência renal, tem sido associado à LV crônica em pacientes com alguma imunossupressão como a causada pelo HIV (LOPEZ-VELEZ et al., 1998).

Nos cães o quadro clínico diferencia-se principalmente pelas manifestações dermatológicas. Inicialmente, os parasitos estão presentes no local de sua inoculação pela picada pelo flebotomíneo e posteriormente, ocorre a migração e infecção de vísceras e distribuição através da derme (BRASIL, 2014). Porém, a LVC é uma doença sistêmica que pode potencialmente envolver qualquer órgão, tecido ou fluido corporal e se manifestar por sinais clínicos inespecíficos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Em alguns cães a doença pode permanecer latente, com a ausência de sinais clínicos evidentes. No Brasil, a forma assintomática da infecção é encontrada com índices variados nos cães, representando 40 a 60% de uma população soropositiva (RIBEIRO et al., 2018). Dentre os sinais clínicos mais frequentes, pode-se destacar a descamação e eczema furfuráceo, as úlceras localizadas mais frequentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações, opacificação do pêlo, onicogribose, hepatoesplenomegalia, adenopatia linfoide, perda de peso, alopecia,

ceratoconjuntivite, apatia, hiperqueratose e paresia das patas posteriores (BRASIL, 2014). Na Figura 1, pode-se visualizar o quadro assintomático e sintomático de um cão com LV onde as lesões dérmicas são evidentes.

Figura 1- Manifestações clínicas em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*.



Legenda: (A) cão assintomático (aparentemente saudável, mas infectado); (B) alopecia generalizada não pruriginosa e várias outras anormalidades dermatológicas.

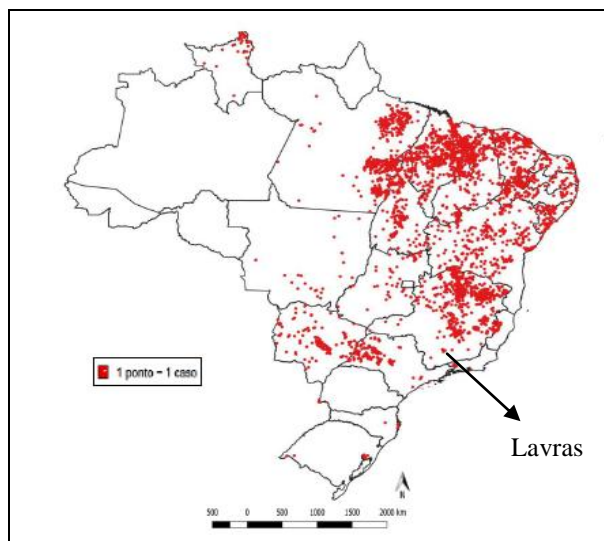
Fonte: Adaptado de Ribeiro et al. (2018).

Com relação às alterações laboratoriais relacionadas à LVC, podem estar presentes anemia normocítica e normocrômica, trombocitopenia, todas decorrentes do parasito na medula óssea, e uma neutrofilia decorrente de uma resposta inflamatória sistêmica advinda de lesões cutâneas ulcerativas e infecção bacteriana secundária. Linfopenia e eosinofilia são ocasionalmente descritas. Analitos biomarcadores de disfunção renal, inflamação e alterações hepatobiliares são frequentemente alterados durante a cronicidade da doença (PALTRINIERI et al., 2016).

Vale ressaltar que esses exames são complementares à avaliação clínica e auxiliam no prognóstico do animal.

A alta prevalência da LVC precede a ocorrência da LVH na mesma localidade (BRASIL, 2014). Este fato pôde ser verificado no município de Lavras/MG. O setor de Vigilância Ambiental do município realizou inquéritos epidemiológicos para avaliar os casos de LVC registrados inicialmente no final do ano de 2013. Em uma amostra de 6782 cães (48,90% da população canina conhecida do município) testados com TR DPP® seguido de confirmação pelo EIE da Biomanguinhos, obteve-se 6,5% de positividade no período de 2014 a 2018 (BLANCO, 2019). Três anos após o aparecimento de casos caninos, ocorreram as notificações de casos humanos, sendo 5 ocorridos em 2017, 2 em 2018 e 1 em 2019, totalizando oito casos e um índice de 25% de letalidade (LAVRAS, 2019). A figura 3 mostra todos os casos de LVH notificados no Brasil em 2017 com destaque aos primeiros casos autóctones do município de Lavras.

Figura 3 - Casos de Leishmaniose Visceral Humana por município, Brasil no ano de 2017.



Fonte: Adaptado de BRASIL (2017).

2.4 Diagnóstico laboratorial da Leishmaniose Visceral Canina

Para um diagnóstico laboratorial são usados testes para confirmar a presença do parasito ou de seus componentes (testes diretos) ou da resposta imune do hospedeiro frente à infecção (testes indiretos). Os testes indiretos mais comuns baseiam-se na sorologia e podem ou não indicar uma infecção patente.

Por outro lado, testes diretos positivos (citologia, histologia, imunohistoquímica, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), cultura e xenodiagnóstico) demonstram a presença de *Leishmania* ou de seu DNA indicando que o parasito estava presente no momento da coleta da amostra biológica (PALTRINIERI et al., 2016).

2.4.1 Técnicas parasitológicas

A citologia visa demonstrar a presença de formas amastigota de *Leishmania* dentro dos macrófagos, ou quando ocorre lise celular, a presença destas formas no líquido do aspirado (PALTRINIERI et al., 2016).

O exame parasitológico direto é feito a partir de um esfregaço da amostra corado por Giemsa, Panótico ou May-Grünwald e visualizado em microscópio óptico, exigindo operador experiente. Quando positivo, são assertivos quanto ao diagnóstico definitivo, o que confere uma elevada especificidade ao teste, chegando a valores de 100% (HERWALDT, 1999). Porém, apresentam muitos resultados falso negativo, não descartando a possibilidade do animal estar infectado, o que reflete sua baixa sensibilidade. As amostras preferenciais são as obtidas de aspirados de medula óssea, linfonodo, baço e fígado, pois estes seriam os locais mais prováveis de encontrarmos o parasito devido ao seu tropismo por células do sistema mononuclear fagocitário. (PALTRINIERI et al., 2016).

2.4.2 Técnicas sorológicas

As técnicas sorológicas baseiam-se no princípio da detecção de anticorpos IgG anti- *Leishmania* produzidos pelo hospedeiro frente ao contato com o patógeno. Os antígenos reconhecidos por esses anticorpos são utilizados para a elaboração das técnicas, onde aquelas amostras que apresentam os anticorpos específicos, reconhecem o antígeno, formando-se um complexo que pode ser reconhecido por um anticorpo secundário ligado à uma enzima, substância cromógena, fluorescente, dentre outras (BRASIL, 2008).

A imunocromatografia é um teste qualitativo de fácil manuseio, de resultado rápido, feito em dispositivo descartável e de potencial aplicabilidade em pesquisas que englobam grande quantidade de cães. Possibilita a coleta de amostra de sangue de apenas cinco microlitros obtidas pela punção capilar em orelha, patas ou cauda (BRASIL, 2016b). O TR imunocromatográfico DPP® (Figura 4) foi desenvolvido pela indústria nacional Bio-Manguinhos e uma empresa norte-americana, a Chembio. O MS introduziu-o para detecção de anticorpos contra *L. infantum* a partir de 2011, recomendando-o como teste de escolha para triagem (COURA-VITAL et al., 2014). Na ausência do DPP®, o Laboratório de Referência Nacional regulamentou o uso do teste rápido ALERE® para o diagnóstico da LVC (FUNED, 2015). Os dois tipos de TR utilizam a proteína recombinante k28 de *L. infantum* (fragmentos k9+k26+k39) com repetição de 39 aminoácidos (BERTOLO, 2016). Estudos demonstraram um bom desempenho do TR DPP® com a proteína K28 e k26/39 alcançando 86% e 90,6% respectivamente de sensibilidade (FRAGA et al., 2016; LAURENTI et al., 2014). No entanto, Grimaldi et al. (2012) demonstraram baixa sensibilidade (47%) em cães clinicamente assintomáticos.

Figura 4. Teste imunocromatográfico rápido DPP®, Bio-Manguinhos. Resultado reagente e não-reagente para detecção de anticorpos contra *L. infantum*, utilizando amostra de sangue venoso.



Legenda: Dispositivo da esquerda demonstrando resultado não-reagente, com o aparecimento apenas da banda controle e dispositivo da direita com resultado reagente, demonstrando coloração de duas bandas.

Fonte: Do autor (2018).

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) baseia-se na detecção de anticorpos através do reconhecimento de antígenos íntegros de promastigotas de *Leishmania* sp. fixados em lâminas de microscopia. Um conjugado com substância fluorescente é utilizado para evidenciação da reação. A leitura é realizada com auxílio de microscópio de fluorescência (BRASIL, 2008). Apresenta especificidade e sensibilidade elevadas em animais sintomáticos. No entanto, a sensibilidade é significativamente diminuída em animais assintomáticos. Sua especificidade decai em regiões com outros patógenos que se sobrepõem geograficamente à *L. infantum* devido às reações cruzadas (TRAVI et al., 2018).

O EIE permite a realização concomitante de grande número de amostras utilizando microplacas revestidas com antígeno (Ag) e um espectrofotômetro que determina a presença de anticorpos pela densidade óptica (TRAVI et al., 2018). Desde 2011, o EIE da Bio-Manguinhos é utilizado como teste confirmatório para a infecção de LVC em inquéritos epidemiológicos após a positividade no TR DPP® (COURA-VITAL et al., 2014). Quando comparado à

RIFI, é menos suscetível ao viés do operador, visto que esta última necessita de microscopista experiente (TRAVI et al., 2018). E quando comparado à imunocromatografia, tanto o EIE quanto a RIFI apresentam a desvantagem do não fornecimento de resultado imediato, além de serem mais complexas, não podendo ter sua utilização em campo (PALTRINIERI et al., 2016).

Todas as técnicas sorológicas apresentam especificidade variável em áreas endêmicas para o *Trypanosoma cruzi*, parasito da mesma família que *L. infantum*, assim como outras espécies de *Leishmania* sp, e outros hemoparasitos como *Babesia* sp, *Ehrlichia* sp e algumas micobactérias, podendo gerar resultados falso positivo (SMRKOVSKI; LARSON, 1977; KRAWCZAK et al., 2015; PALTRINIERI et al., 2016). Além disso, a sensibilidade e especificidade vão variar de acordo com o antígeno empregado e a sensibilidade ainda é variável nos cães infectados sem expressão clínica (SOLANO-GALLEGO et al., 2014).

Lemos (2014) comparou o antígeno recombinante K39, que possui uma sequência de 39 aminoácidos repetitivos derivados da proteína kinesina, com um novo Ag recombinante rKDDR (“Kinesin Degenerated Derived Repeat”) composto por uma sequência recorrente de 8,5 blocos repetitivos de 39 aminoácidos da kinesina. Testando-o em um EIE, obteve-se 88,54% de sensibilidade e 97,30% de especificidade. Em contrapartida a rK39 apresentou uma sensibilidade de 78,13% e especificidade de 90,09%. Recentemente Siqueira (2018) aprimorou o rKDDR com o desenvolvimento do Ag recombinante KDRR-plus que possui uma quantidade exacerbada de uma sequência repetitiva de aminoácidos constituída por cerca de 15 motivos repetitivos de 39 aminoácidos da proteína kinesina, com objetivo de conferir uma ampliação do seu potencial antigênico. Este antígeno sintético fora testado e avaliado em ensaios de reconhecimento sorológico por EIE e por TR imunocromatográfico de fluxo lateral para o diagnóstico da LVC. O rKDDR-

plus aumentou a especificidade (97,50%) do EIE, melhorando o índice de acurácia (97,22%) quando comparado ao seu precursor rKDDR (92,78%) e aos Ags rK26, rK39 e ao extrato bruto de *L. infantum*. Já o parâmetro de sensibilidade (59,50%) do TR foi considerado insatisfatório, principalmente em animais assintomáticos.

2.4.3 Técnicas de biologia molecular

A técnica molecular denominada Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite amplificar seletivamente sequências já identificadas do DNA do parasito, utilizando uma variedade de tecidos, sangue e fluidos corporais. Porém, a técnica é mais sensível com as amostras de biópsias cutâneas, baço, medula óssea, linfonodo e conjuntiva (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Esta técnica possui elevada sensibilidade e especificidade com essas amostras correspondendo ao maior número de resultados positivos em comparação com outros locais de coleta, visto serem os principais locais do hospedeiro acometidos pelo parasito (TRAVI et al. 2018; KHADEM VATAN et al., 2011). A PCR independe do estado clínico e imunológico do animal podendo ser utilizada em caso de anergia ou de reações cruzadas em testes sorológicos (MILES et al., 1999). A técnica pode ser qualitativa (PCR convencional) ou quantitativa (PCR em tempo real). Esta última apresenta vantagens por ser executada em sistemas fechados em que a amplificação e detecção ocorrem simultaneamente., portanto, menos propensos à contaminação (PALTRINIERI et al., 2016).

Há diversos alvos para a PCR, porém os minicírculos de DNA contidos no cinetoplasto de *Leishmania* (kDNA) são o alvo molecular para a maioria, destinados a detectar o gênero *Leishmania* e parecem ser os mais sensíveis para detecção direta em tecidos infectados (GALLUZZI et al., 2018). A sensibilidade

analítica dos testes moleculares sugere que eles podem detectar entre 0,001 e 0,1 parasita / reação (OLIVEIRA et al., 2005). A inexistência de padronização da metodologia da PCR nos laboratórios, assim como a invasividade da coleta de algumas amostras como aspirado de medula, linfonodo, baço e biópsia de pele, são as maiores dificuldades encontradas na utilização ampla desta técnica (TRAVI et al., 2018). Estudos vêm demonstrando resultados satisfatórios de desempenho com a utilização de células da mucosa conjuntival na PCR. O uso desta amostra torna-se facilitada pelo tipo de coleta não ser invasiva, de fácil execução e podendo ser realizada em campo, feita apenas com a utilização de um “swab” estéril. (PILATTI et al, 2009; FERREIRA et al., 2012; LOMBARDO et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar diferentes metodologias utilizadas no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina em um município de transmissão recente e sua microrregião.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os animais que compõe o presente estudo;
- Identificar as medidas de profilaxia e controle da LVC adotadas nestes animais;
- Verificar a concordância de resultados do TR-DPP® a partir de amostra de diferentes sítios anatômicos do cão;
- Verificar o desempenho da proteína rKDRR-plus para o diagnóstico da LVC;
- Verificar o desempenho e concordância de resultados entre técnicas imunocromatográficas, imunoenzimáticas, parasitológicas e moleculares em grupos com a presença ou ausência de sinais clínicos de LVC;
- Identificar as espécies de *Leishmania* presentes nos animais com resultado positivo nos testes moleculares.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos de coleta e procedimentos anestésicos foram realizados exclusivamente por médico veterinário, conforme art. 3º, da Resolução nº 877, de 15 de fevereiro de 2008 do CFMV. A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras (UFLA) aprovou o projeto em 22/12/17, conforme consta no atestado nº 77/17.

4.2 Área de estudo

O estudo foi realizado entre agosto de 2018 e janeiro de 2019 no município de Lavras, localizado no sul do estado de Minas Gerais, Brasil. Possui área territorial de 564,7 km² com 37,4% de suas vias públicas urbanizadas, população estimada de 2018 de 102.728 pessoas e salário médio mensal dos trabalhadores formais de 2,5 salários mínimos (dados de 2016) (IBGE, 2017). Possui 83,48% dos jovens de 18 a 24 anos com escolaridade de 2º ciclo fundamental completo (BRASIL, 2010), coeficiente de mortalidade de 5,9 e mortalidade infantil de 17,5 (dados de 2008) (BRASIL, 2009). A população canina conhecida, baseada em campanha de vacinação antirrábica do ano de 2018, é de 13.868 animais (LAVRAS, 2019).

De acordo com o MS o município é considerado de transmissão recente para a LV, com casos autóctones de LVC desde 2013 e de LVH desde 2017, caracterizando uma transmissão contínua. A classificação de intensidade de transmissão foi classificada como moderada, cuja média anual de casos humanos nos últimos três anos foi de 2,66 casos (BRASIL, 2016a).

Cidades circunvizinhas ao município de Lavras também participaram do estudo: Nepomuceno (sem registros de LVC e LVH anteriores à pesquisa), Campo Belo, Ijaci e Ribeirão Vermelho, com registros apenas de casos caninos.

4.3 Tipo de estudo

O estudo é do tipo observacional transversal, com foco na avaliação exploratória de teste diagnóstico a fim de analisar a validade externa das técnicas selecionadas.

Os itens essenciais preconizados pela ferramenta STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) de 2007 (Anexo A) e iniciativa STARD (Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy) de 2015 (Anexo B) foram adotados.

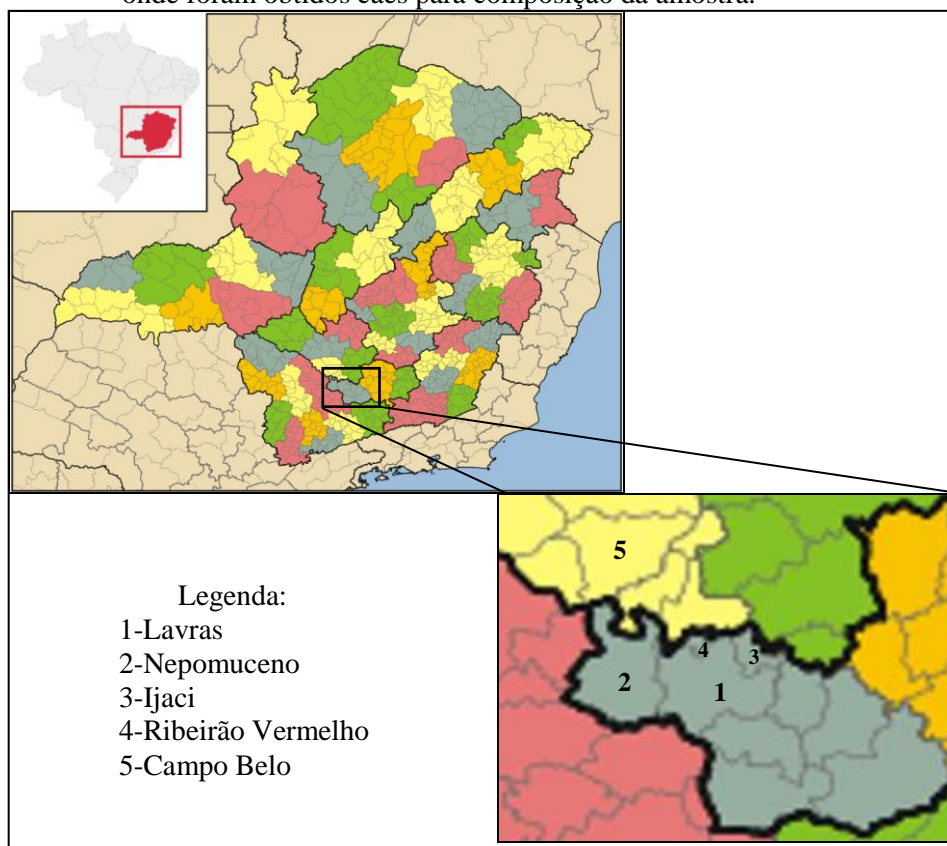
4.4 Critérios de seleção da amostra

A composição da amostra ocorreu por livre demanda até o período final estipulado para coleta, desde que os cães selecionados estivessem enquadrados nos critérios de inclusão. A amostra não-probabilística foi composta por 52 cães provenientes do município de Lavras (44/52), e cidades circunvizinhas (Figura 5) como Ijaci (1/52), Ribeirão Vermelho (3/52), Nepomuceno (3/52) e Campo Belo (1/52).

Para inclusão dos cães na amostra, os tutores assinaram um termo de autorização (Apêndice A) para todos os procedimentos realizados e utilização de dados em meios científicos. Como critério de inclusão, foram selecionados cães sem distinção de raça e gênero, sendo excluídos aqueles que apresentavam idade inferior a um ano e/ou em estado clínico em que a punção de medula óssea pudesse oferecer risco à saúde do animal, assim como os cães que estavam

fazendo tratamento com uso de medicamento imunossupressor. Para verificação do estado de saúde do animal e confirmar se este estava apto ao aspirado da medula, foram realizados exames clínicos, hemograma e dosagens bioquímicas de rotina, como uréia, creatinina, AST (aspartato amino transferase), ALT (alanina amino transferase), GGT (glutamato transferase) e fosfatase alcalina.

Figura 5. Localização do município de Lavras, MG e as cidades circunvizinhas onde foram obtidos cães para composição da amostra.



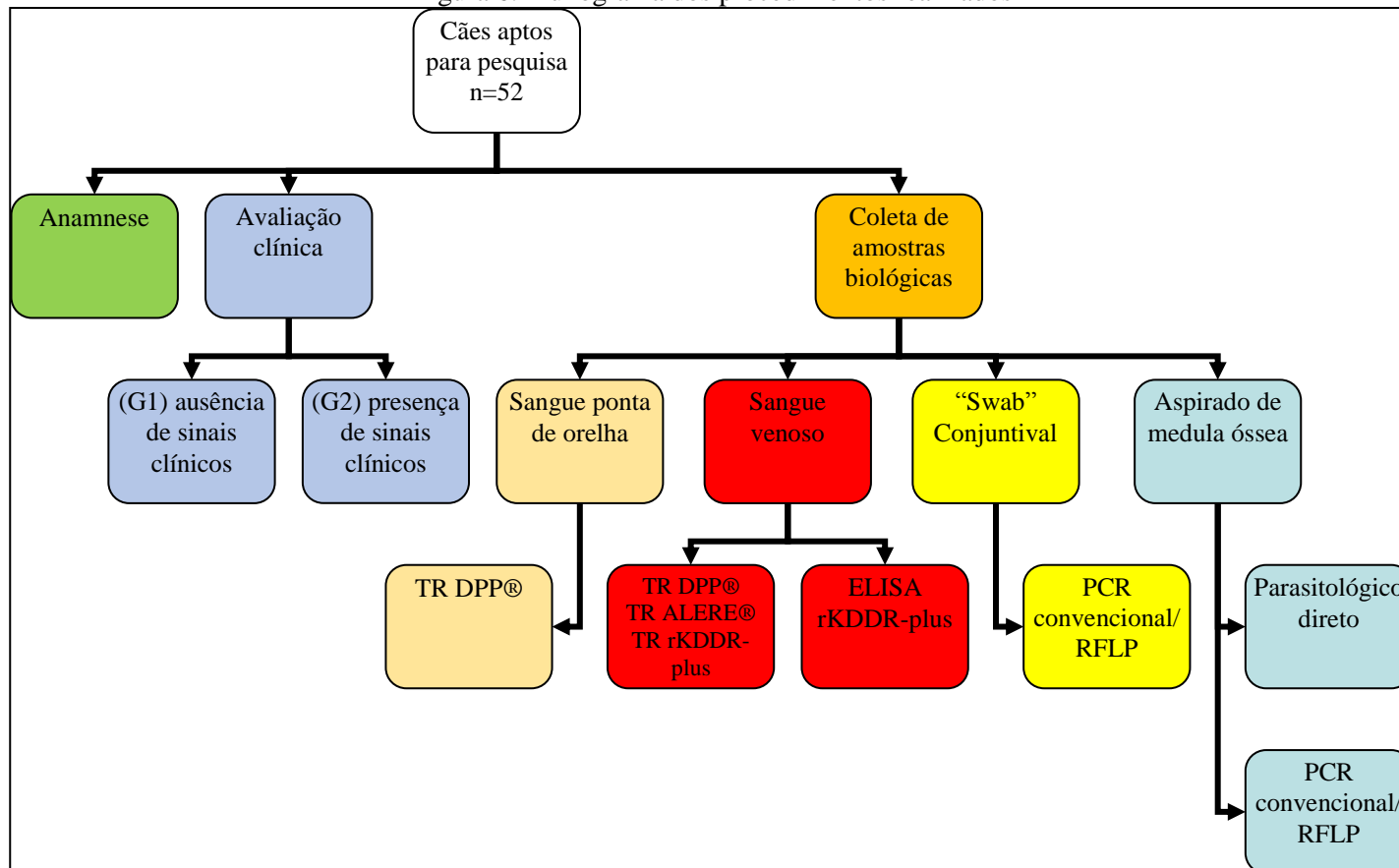
Fonte: Adaptado de:

https://pt.wikipedia.org/wiki/Lista_de_mesorregi%C3%B5es_e_microrregi%C3%B5es_de_Minas_Gerais (2019).

4.5 Fluxograma dos procedimentos realizados

Os cães receberam um código numérico gerado pelo software Tag Soft® (Tag Soft, Brasil) do Hospital Veterinário para eliminação de possíveis vieses na identificação das amostras e que pudessem influenciar nos resultados dos exames laboratoriais. Todos os cães selecionados passaram pelos seguintes procedimentos: anamnese (exceto os advindos do setor de Patologia Veterinária da UFLA, visto que não houve contato com os tutores desses cães); avaliação clínica externa e separação em grupos com ausência ou presença de sinais clínicos; coleta de sangue total de ponta orelha para realização do TR DPP®; coleta de sangue venoso e separação do plasma para realização de testes imunocromatográficos (DPP®, TR ALERE® e TR com Ag r-KDDR) e ELISA com Ag r-KDDR; punção de medula óssea para realização de exame parasitológico direto e PCR convencional; coleta de “swab” conjuntival para realização de PCR convencional (FIGURA 6).

Figura 6. Fluxograma dos procedimentos realizados



Fonte: Do autor (2019).

4.5.1 Coleta de dados e amostras biológicas

4.5.1.1 Anamnese

Foi criado um banco com os dados obtidos a partir da anamnese dos animais incluídos no presente estudo contendo informações referentes ao endereço, uso de coleiras impregnadas com repelentes, estado vacinal para LVC, dentre outras características (APÊNDICE B).

4.5.1.2 Coleta de sangue total por lanceta

Para a coleta de sangue foi realizada assepsia da ponta da orelha com algodão embebido em álcool 70% e posterior perfuração com lanceta de metal e recolhimento de aproximadamente 5 μ L de sangue total, utilizando alça coletora de plástico do kit TR DPP® (Bio-Manguinhos, Brasil).

4.5.1.3 Coleta de sangue venoso

O volume de 4mL de sangue venoso foi coletado na veia jugular após compressão suave na região do pescoço e assepsia com álcool 70%, e a punção foi realizada com agulha (25x0,8mm) e seringa de 5mL. O sangue colhido foi armazenado em um tubo estéril com o anticoagulante EDTA. Os tubos foram centrifugados a 490g por 10 minutos, e o plasma foi separado em alíquotas de 400 μ L em microtubos e armazenados à temperatura de -20° C.

4.5.1.4 Coleta de células da mucosa conjuntival

Foi utilizado um “swab” estéril para coleta de células epiteliais nas pálpebras inferiores dos dois olhos do cão. A coleta foi feita rolando suavemente a ponta de algodão do mesmo “swab” em cada pálpebra. A haste do “swab” foi cortada e a ponta de algodão armazenada em microtubo à temperatura de -20°C.

4.5.1.5 Punção da medula óssea

Para coleta de amostra de medula óssea foi realizado o protocolo do Hospital Veterinário da UFLA, aprovado pelo Comitê de Ética e Uso em Animais (CEUA/UFLA).

Para a realização da coleta os animais fizeram jejum de 12 horas, e restrição hídrica por seis horas para minimizar o risco de aspiração pulmonar de conteúdo gástrico durante a anestesia. Os animais foram submetidos à medicação pré-anestésica por meio de aplicação intramuscular de maleato de acepromazina 0,2%, na dose de 0,05 mg/kg, associado ao cloridrato de tramadol 50 mg/ml, na dose de 4 mg/kg. A indução e manutenção anestésica ocorreram por meio de aplicação endovenosa de propofol 10 mg/ml na dose de 5 mg/kg. Após anestesia, a anti-sepsia da crista do osso esterno foi feita com clorexidina 2% degermante e clorexidina 0,5% alcoólica e iodopolividona tópica 10%. Foi utilizada seringa descartável estéril (20 ml) acoplada a uma agulha hipodérmica calibre 18G (40x1,2mm) com uma aspiração de aproximadamente 2mL de medula óssea (PAPARCONE et al., 2013). O aspirado da medula foi realizado no osso esterno, por ser um local mais macio onde a cobertura de tecido mole é mínima e a hematopoiese permanece ativa durante a idade adulta (GRYNPAS et al., 1992). Medicamentos emergenciais, como epinefrina, atropina e diazepam estavam previamente fracionadas nas doses correspondentes ao peso de cada animal, sendo: sulfato de atropina 0,5 mg/ml na dose de 0,044 mg/kg intravenoso no intervalo de 1 dose por minuto, 3 doses no máximo, em casos de

bradicardia; epinefrina 1 mg/ml na dose 0,1 mg/kg intravenoso no intervalo de 1 dose por minuto, 3 doses no máximo, em casos de parada cardíaca; diazepam 5 mg/ml na dose 0,5 mg/kg intravenoso a cada 15 minutos em caso de convulsão do animal.

Foram feitos quatro esfregaços com o aspirado de medula e o restante do material foi transferido para um tubo estéril com EDTA e armazenado à temperatura de -20°C.

A medula dos animais advindos do setor de patologia foi colhida após a realização da eutanásia, durante o procedimento de necropsia do animal, em que o osso foi cortado e a medula retirada.

4.5.2 Avaliação clínica

Todos os cães passaram por uma avaliação clínica por médico veterinário para avaliação do estado geral do animal e verificação de presença de possíveis sinais clínicos externos que pudessem estar associados à LVC. Os sinais verificados foram os adotados, segundo o Manual de Vigilância e Controle da LV do Ministério da Saúde (BRASIL, 2014).

Os animais foram agrupados de acordo com a ausência ou presença de sinais clínicos. Foi utilizado um escore (1 ou 2) para classificação dos animais de acordo com a avaliação dos sinais clínicos. Sinais característicos de animais oligossintomáticos, receberam o escore 1 e para os sinais mais evidentes da doença, característicos de animais sintomáticos, foi padronizado o escore 2. Os cães que obtiveram uma soma na pontuação final de 0-3 pontos, foram classificados com ausência de sinais clínicos e os que apresentaram mais de 3 pontos, classificados como animais com presença de sinais clínicos, conforme demonstra a Tabela 1. A classificação de animais com ausência ou presença de sinais clínicos através da adoção de um escore foi baseada em outros estudos

anteriores de avaliação de acurácia de teste diagnóstico da LVC (QUINNELL et al., 2001; BORJA et al., 2018).

Tabela 1. Valores de escore padronizados para sinais clínicos relacionados à LVC e classificação quanto à pontuação final

SINAL CLÍNICO	ESCORE
Adenopatia linfoide	1
Pequena perda de peso	1
Pêlo opaco	1
Alopecia	2
Eczema furfuráceo	2
Úlceras	2
Hiperqueratose	2
Onicogribose	2
Emagrecimento acentuado	2
Ceratoconjuntivite	2
Paresia das patas posteriores	2

*Pontuação final 0 a 3 = animal com ausência de sinais clínicos

**Pontuação final maior que 3 = animal com presença de sinais clínicos

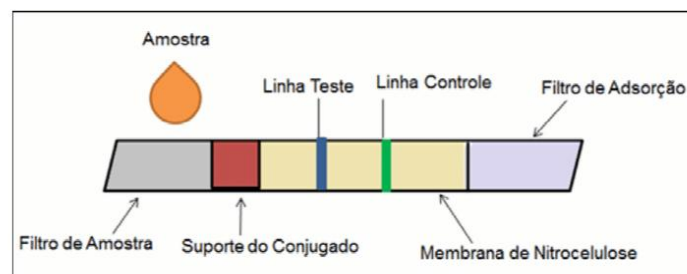
Fonte: Do autor (2019).

4.5.3 Realização de testes imunocromatográficos

O plasma colhido nos cães, após centrifugação e separação das células sanguíneas, foi utilizado para realização dos testes imunocromatográficos. O TR de dupla migração DPP® (Bio-Manguinhos, Brasil) e o TR ALERE® (Abbott, Brasil) de fluxo lateral, ambos com a proteína k28, foram realizados segundo as especificações do fabricante.

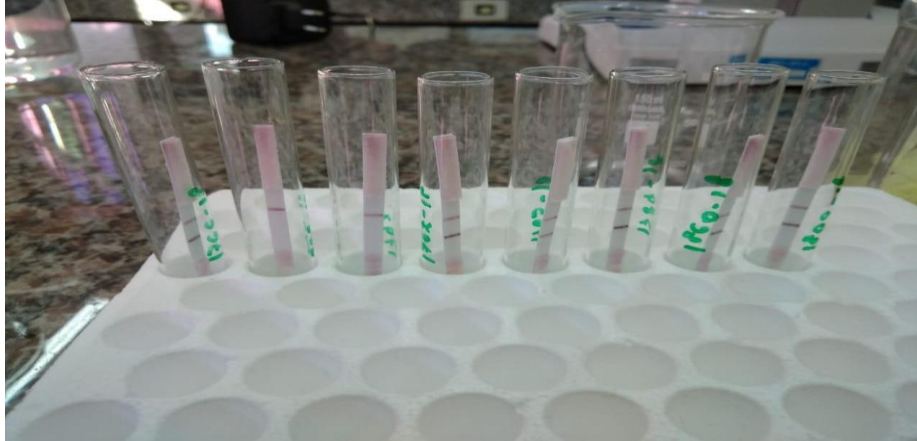
O TR rKDDR-plus foi desenvolvido pela empresa SafeTest Diagnósticos, sendo de fluxo lateral, feito em uma fita de nitrocelulose com uma área para absorção da amostra e de uma solução tampão, constituída por fibras de celulose, seguida de outra área com a membrana do conjugado, composta por partículas de ouro-coloidal que estão ligadas a anti-IgG canino. Em seguida tem-se a área teste, onde o Ag rKDDR-plus está impregnado e a área do controle com a proteína A. Na extremidade, tem-se uma área de absorção do excesso do fluxo, também composta de fibra de celulose (FIGURA 7) (SIQUEIRA, 2018). O TR rKDDR-plus foi realizado com a adição de 50µL de uma solução tampão e 20µL de plasma em um tubo de ensaio, com a adição da fita em posição vertical. Após 20 minutos foi feita a leitura do resultado, sendo que o aparecimento apenas da banda controle indicou resultado negativo e o aparecimento de duas bandas indicou resultado positivo, conforme Figura 8. Para os três tipos de testes, a leitura foi feita por dois observadores e qualquer coloração na banda da amostra, mesmo que clara, foi considerada como resultado positivo.

Figura 7. Componentes do teste imunocromatográfico de fluxo lateral



Fonte: JAPOLLA et al. (2015).

Figura 8. Teste rápido imunocromatográfico com Ag rKDDR-plus



Fonte: Do autor (2018)

4.5.4 Ensaio imunoenzimático com antígeno rKDDR-plus

O protocolo utilizado para o ensaio imunoenzimático foi padronizado pela equipe do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Placas de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) de 96 wells (Costar®, EUA) foram sensibilizadas por no mínimo 16 horas, a 4°C com 50 ng de Ag rKDDR-plus diluído em 100µL de tampão carbonato [Na₂CO₃ 15 mM (Synth, Brasil); NaHCO₃ 34 mM (Merck, Brasil) ajustado para pH 9,6]. Após a sensibilização, foi descartado o conteúdo das placas e estas foram bloqueadas com 150 µL de PBS 1X-BSA (Fitzgerald, EUA) a 2%, pH 7,4, durante 1 hora em banho-maria a 37°C. Após o bloqueio das placas e descarte da solução, adicionaram-se 100 µL do plasma canino diluído na proporção de 1:100 em PBS 1X-Tween20 a 0,05% (pH 7,4) e incubados por no mínimo 16 horas a 4°C. As placas foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (PBS 1X - Tween20 a 0,05%) e adicionaram-se 100 µL do anticorpo anti-IgG canino, conjugado à enzima peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), diluído em PBS 1X-Tween20 a

0,05% na proporção de 1:2500. As placas foram incubadas a temperatura de 37°C em banho-maria por 1 hora e 30 minutos e depois foram novamente lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (PBS 1X-Tween20 a 0,05%). Foram adicionados 100 µL da solução reveladora (citrato 0,1 M; Na₂PO₄ 0,2 M; OPD 0,05% e H₂O₂ 0,1%) em cada poço e as placas foram incubadas a temperatura de 37°C em banho-maria, ao abrigo de luz, por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de 4N H₂SO₄. A absorbância resultante da reação foi mensurada em leitor de microplacas de ELISA a 492 nm (SIQUEIRA, 2018).

O ponto de corte foi calculado utilizando-se a área sob a curva (AUC) através da construção da curva ROC (“Receiver Operator Curve”) consistindo na representação gráfica da sensibilidade no eixo vertical, e o complemento da especificidade no eixo horizontal, utilizando como controle negativo, o plasma de cães não infectados (parasitológico e PCR de medula óssea negativados) de área endêmica. Como controle positivo foi utilizado plasma de cão com exame parasitológico e PCR de medula óssea confirmados para *L. infantum*. A média dos valores de absorbância das amostras iguais ou maiores ao ponto de corte foram considerados como resultado positivo e valores menores, como negativo. As reações foram realizadas em triplicata tanto para os controles quanto para as amostras de plasma canino.

4.5.5 Parasitológico direto da punção de medula óssea

Foram feitos quatro esfregaços em lâmina de microscopia com o aspirado da medula óssea de todos os cães. Após secagem do esfregaço, as lâminas foram coradas pelo corante hematológico Panótico Rápido® (Laborclin, Brasil) seguindo o procedimento descrito pelo fabricante. Foram observados no

mínimo 200 campos em microscópio óptico na objetiva de imersão para observação de formas amastigota de *Leishmania*.

4.5.6 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de medula óssea foram realizadas segundo os procedimentos descritos no manual do Kit Genomic DNA from tissue, NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Alemanha) com modificações apenas na fase da eluição do DNA, onde foram adicionados 50µL de água ultrapura ao microtubo, ao invés de 100µL de solução de Tampão BE proveniente do Kit, e o tempo de incubação em temperatura ambiente foi alterado para 10 minutos.

Para a extração de DNA do “swab” conjuntival foi utilizado o kit DNeasy Blood & Tissue® (QIAGEN, Alemanha) com modificações no procedimento descrito pelo manual, conforme a seguir:

- O algodão do “swab” foi removido com lâmina de bisturi estéril e transferido para o microtubo de 1,5 ml livre de DNase; foram adicionados 300 µL de tampão ATL, misturado com auxílio do aparelho de vortex em pulsos de 5 segundos;

- Foram adicionados 33 µL de proteinase K e misturados em pulsos de 10 s; os microtubos foram incubados a 56°C por 16 horas;

- O algodão foi removido e os tubos foram misturados em pulsos de 15 s; foram adicionados 334 µL do tampão AL e misturados em vortex com pulsos de 10 s;

Os demais passos foram seguidos conforme as instruções do fabricante, exceto pelo tempo de incubação dos microtubos à temperatura ambiente antes da última centrifugação que foi alterado para 10 minutos.

Após a extração do DNA das amostras de medula óssea e de “swab”, o DNA foi dosado em espectrofotômetro nas razões 260/280 nm e 260/230 nm.

4.5.7 PCR convencional

Cada amostra teve seu DNA ajustado para uma dosagem de 20 a 100 nanogramas/ μ L. As reações de PCR foram preparadas em uma estação de trabalho após uso de luz ultravioleta. As reações foram preparadas segundo o protocolo adaptado de Lachaud et. al (2002), sendo que em cada microtubo foram adicionados 4 μ L de 5X GoTaq, 0,4 μ L de dNTP 10mM, 0,25 μ L de Taq (5U/ μ l), 1 μ L de cada primer a 10 μ M e 11,75 μ L de uma mistura de água ultrapura e DNA da amostra, que continha de 20 a 100 ng de DNA (LACHAUD et. al, 2002). Para a PCR foram utilizados iniciadores específicos para subgênero *Leishmania* que têm como alvo o DNA do cinetoplasto de minicírculo (kDNA) (TABELA 2).

Tabela 2. Iniciadores usados nas reações de PCR com suas respectivas seqüências e tamanhos de produtos amplificados.

ALVO	PRIMER	SEQUÊNCIA	TAMANHO DO AMPLICON (PARES DE BASE)
Subgênero	kDNA, Leish, F	5' CGTGGGGGAGGGGCGTTCT 3'	
<i>Leishmania</i>	kDNA, Leish, R	5' CCGAAGCAGCCGCCCTATT 3'	135

Fonte: Adaptado de CARDOSO et al. (2019).

Os microtubos foram colocados em termociclador automático com as seguintes condições de ciclo térmico: desnaturação inicial a 94 ° C durante 5 minutos; seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 59°C por 30s e extensão a 72°C por 30s; em seguida extensão final a 72°C durante 7 minutos.

As amostras foram submetidas à eletroforese em um gel de agarose 2% corados com brometo de etídio (0,5µg/mL), utilizando um padrão de peso molecular de 100 pares de base, e o gel foi visualizado à luz ultravioleta, utilizando o Image Quant LAS4000 (GE Healthcare Life Science). Foi utilizado como controle positivo o DNA extraído de formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e água ultrapura como controle negativo.

4.5.8 Identificação de espécie pelo polimorfismo de fragmentos de DNA (RFLP)

Para a identificação da espécie de *Leishmania*, foram selecionadas 6 amostras positivas na PCR convencional, que obtiveram resultados negativos em todos os testes sorológicos, mas positivo na PCR; ou que obtiveram resultado negativo na PCR feita com medula, mas positivo quando feito com a amostra de “swab” conjuntival. Foi realizada a PCR convencional utilizando os iniciadores (LITSR:5´CTGGATCATTTTCCGATG3´e L5.8S:5´TGATACCACTTATCGC ACTT3´) endereçados para o alvo ITS I (Internal Transcribed Spacer I) a 10µM. As amostras foram digeridas com a enzima “HaeIII”(10U/µL) (Promega, EUA). A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 µL contendo 1µL de “HaeIII” (10U/mL), 1,5 µL de tampão da enzima, 2,5 µL de água ultrapura e 10 µL de produto de PCR. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas e os perfis de restrição analisados em gel de agarose 4% e comparados com os seguintes perfis de *Leishmania*: *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) (DE CASTRO, 2017).

4.6 Padrão de referência

O padrão de referência ou padrão ouro, para avaliação dos testes diagnóstico, foi composto de: visualização de formas amastigotas do parasito no esfregaço de medula óssea; presença de DNA de *Leishmania*. (*Leishmania*) sp detectado pela PCR na medula óssea; presença de DNA de *Leishmania* (*Leishmania*) sp detectado pela PCR no “swab” conjuntival.

O animal foi considerado não infectado (verdadeiro negativo) quando este foi negativado em todos os testes incluídos no padrão de referência, e o animal infectado (verdadeiro positivo) foi definido quando obteve ao menos um resultado positivo em qualquer um dos testes da composição do padrão de referência.

4.7 Análise de dados e análise estatística

Cada teste diagnóstico foi avaliado em relação à sensibilidade, especificidade e acurácia. Para a análise de concordância entre os testes diagnósticos foi utilizado o teste Kappa, e os valores interpretados de acordo com Landis e Kockh (1977) (TABELA 3).

Tabela 3. Relação entre os valores de kappa e a força de concordância

ESTATÍSTICA KAPPA	FORÇA DE CONCORDÂNCIA
< 0,00	pobre
0,00-0,20	leve
0,21-0,40	justa
0,41-0,60	moderada
0,61-0,80	substancial
0,81-0,99	quase perfeita
1,00	perfeita

Fonte: Adaptado de LANDIS; KOCKH (1977).

Para comparações entre a frequência absoluta de positividade dos testes diagnóstico com o padrão de referência, as diferenças foram detectadas pelo teste de McNemar e consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Todas as análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism®5.0 (GraphPad Inc, EUA) e o programa Microsoft Excel® 2010 (Microsoft, EUA) para o processamento e organização dos dados.

Todos os exames laboratoriais foram realizados em condições de ocultação, em que os executores não obtiveram conhecimento dos resultados dos outros testes para a mesma amostra.

5 RESULTADOS

5.1 Características e informações adquiridas pela anamnese

A amostra final foi constituída de 52 animais (Tabela 4) sendo:

- 11 cães recolhidos pela equipe da Vigilância Ambiental da Prefeitura Municipal de Lavras e encaminhados para eutanásia para o setor de Patologia Veterinária da UFLA;

- 20 cães oriundos de casuística hospitalar;

- 21 cães cujos tutores buscaram o projeto por demanda espontânea.

Tabela 4. Caracterização da população de cães submetidos a diferentes procedimentos metodológicos, para diagnóstico da Leishmaniose Visceral, em uma área de transmissão recente, no município de Lavras, Minas Gerais, no período de agosto de 2018 a janeiro de 2019.

CARACTERÍSTICA		FREQUÊNCIA (%) N=52
SEXO	Macho	53,85
	Fêmea	46,15
IDADE (anos)	1 a 3	40,38
	4 a 7	23,08
	8 ou mais	13,46
	sem informação	23,08
	Sem definição	53,85
RAÇA	Shitzu	7,69
	Pug	5,77
	Boxer	3,85
	Poodle	3,85
	Labrador	3,85
	Outras raças *	21,14
QUADRO CLÍNICO DA LVC	Ausência de sinais clínicos	40,38
	Presença de sinais clínicos	59,62

* Raças que obtiveram apenas um único cão representativo

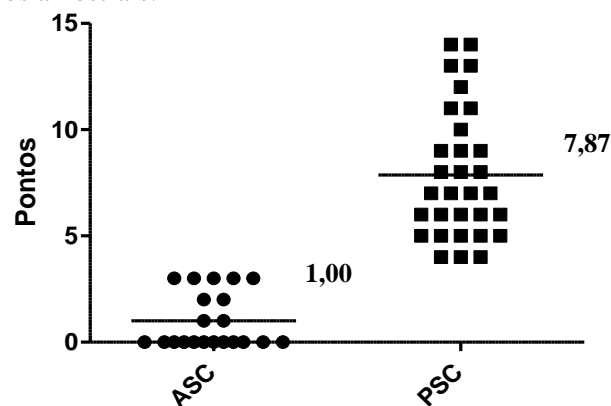
Fonte: Do autor (2019)

Dos cães amostrados, 17 já haviam sido diagnosticados com LVC através de técnicas sorológicas, 23 eram cães suspeitos sem confirmação e 12

não eram suspeitos da doença, onde o tutor havia optado participar do projeto espontaneamente e/ou procurado o atendimento hospitalar por outros motivos, como castração e procedimentos cirúrgicos. Os cães que já haviam sido diagnosticados com LVC não foram excluídos da amostragem pelo fato de terem sido utilizadas apenas técnicas sorológicas para a confirmação laboratorial. Assim, os resultados dos testes moleculares e parasitológico do padrão de referência poderiam avaliar se todos os cães foram diagnosticados corretamente.

No presente trabalho verificou-se que 59,62% (n=31) dos animais apresentavam sinais clínicos físicos compatível com a LVC (Figura 9) e os quatro sinais clínicos mais frequentes foram a presença de pelo opaco (46,15%), alopecia localizada (44,23%), hiperqueratose e adenopatia linfoide (42,31% para ambos) (FIGURA 10). Dentre os cães que se enquadraram no grupo com ausência de sinais clínicos, (n=21), 52,4% apresentaram o escore zerado, ou seja, nenhum dos sinais clínicos da Tabela 1 foram demonstrados nesses cães segundo a avaliação dos médicos veterinários.

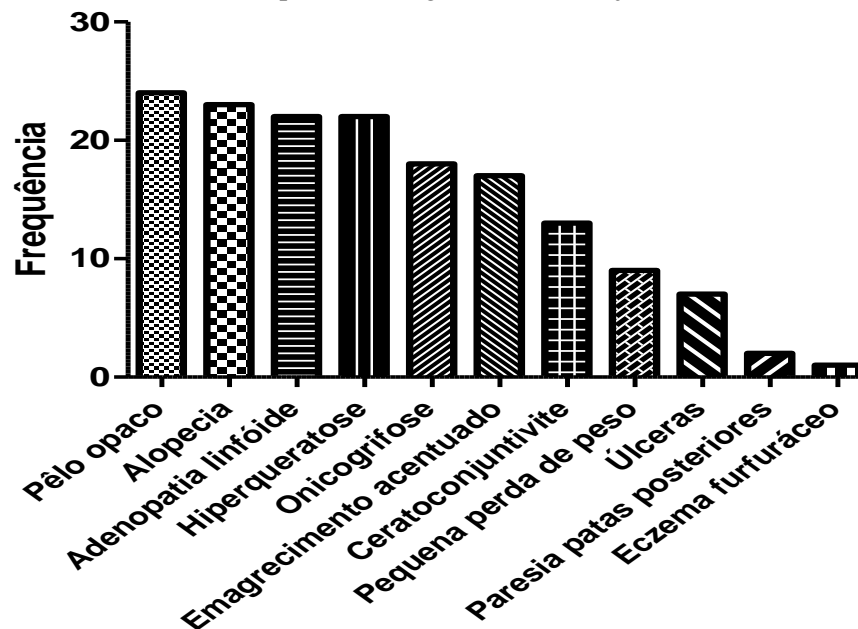
Figura 9. Distribuição de frequência do escore clínico obtido entre os dois grupos amostrais.



Legenda: (ASC) - ausência de sinais clínicos; (PSC) – presença de sinais clínicos.

Fonte: Do autor (2019).

Figura 10. Frequência absoluta de sinais clínicos sugestivos de Leishmaniose Visceral Canina observados em cães residentes no município de Lavas, Minas Gerais, no período de agosto de 2018 a janeiro de 2019.



Fonte: Do autor (2019).

Na Tabela 5 estão apresentadas as informações fornecidas pelos proprietários/tutores, no que tange ao uso de medidas profiláticas com relação à LVC. Apenas um cão fazia uso de coleira impregnada com repelente para flebotômico e estava simultaneamente vacinado. Dos cães que tinham o hábito de passar a maior parte do tempo em quintais ou área externa da casa, podendo ter maior exposição aos vetores da LV, 50% não utilizavam a coleira. Dos cães que tinham o hábito de sair sem a presença do tutor, 62,5% residiam próximo a área com mata e vegetação abundante.

Dentre os cães da amostra, em cinco haviam anticorpos contra *L. infantum* diagnosticados anteriormente, e já haviam iniciado recentemente o tratamento. Apenas um desses cães estava fazendo uso de miltefosina há apenas cinco dias, sendo que os outros quatro faziam uso de alopurinol isolado ou

associado com domperidona. Nenhum dos cães em tratamento havia feito teste molecular para o diagnóstico da LVC. Dentre os cães em tratamento, dois não faziam o uso da coleira com repelente.

Tabela 5. Frequência de medidas profiláticas em relação à Leishmaniose Visceral Canina, adotadas por proprietários/tutores e hábitos de cães provenientes do município de Lavras, Minas Gerais, no período de agosto de 2018 a janeiro de 2019.

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES	FREQUENCIA (%)	
		n=52
VACINAÇÃO (LEISHTEC®)	Sim	3,85
	Não	76,92
	Sem informação	19,23
COLEIRA REPELENTE PARA FLEBOTOMÍNEO	Sim	38,46
	Não	34,62
	Sem informação	26,92
LOCAL ONDE O CÃO PERMANECE A MAIOR PARTE DO TEMPO	Área interna da casa	23,08
	Área externa da casa*	51,92
	Sem informação	25,00
PRESENÇA DE ÁREA VERDE SUBJACENTE**	Sim	30,77
	Não	21,15
	Sem informação	48,08
CÃO TEM O HÁBITO DE SAIR SEM A PRESENÇA DO TUTOR	Sim	15,38
	Não	57,69
	Sem informação	26,92

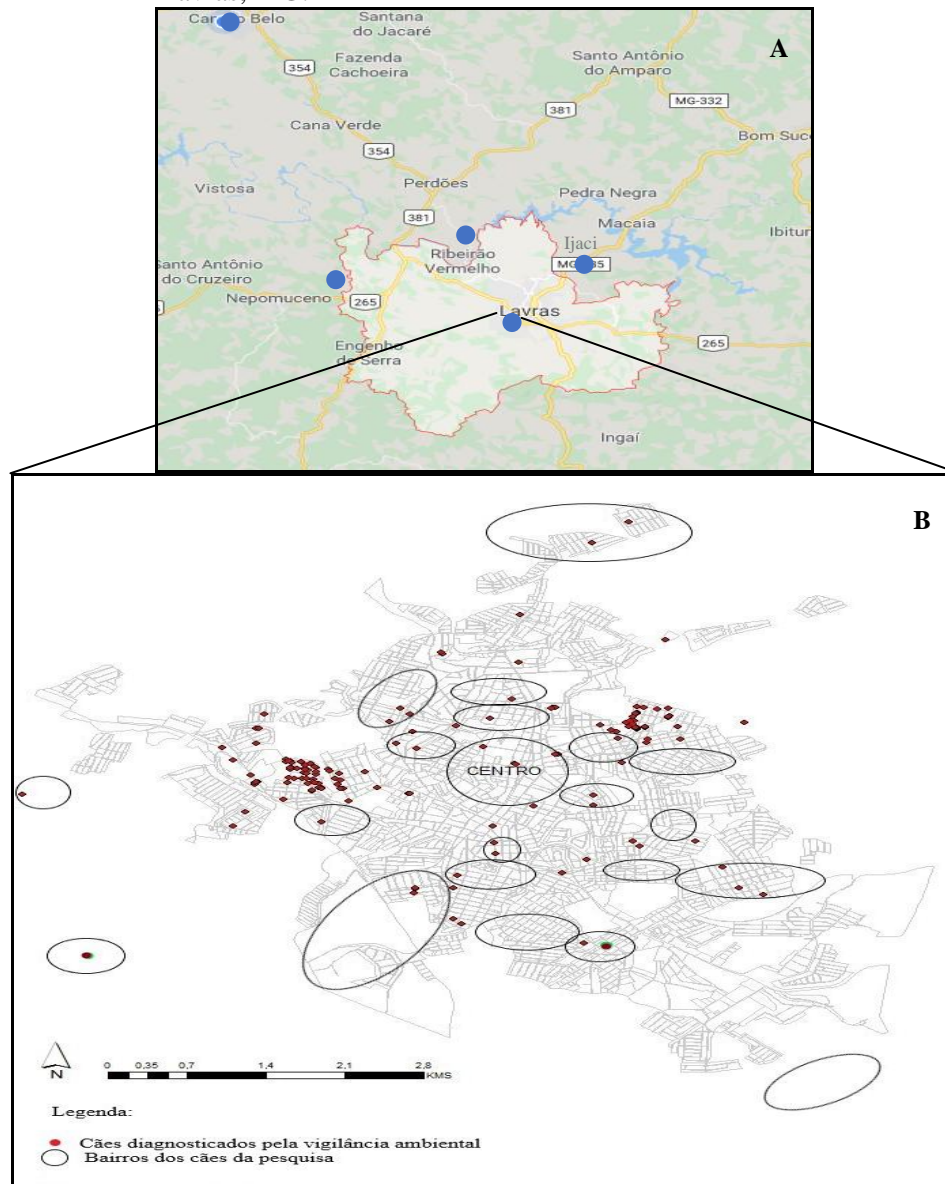
* Quintal ou canil não telado

** Até 200 metros

Fonte: Do autor (2019).

A localização espacial dos bairros dos cães avaliados de Lavras foi inserida no mapa da Figura 11, que representa o inquérito epidemiológico para LVC realizado pela vigilância ambiental no ano de 2017.

Figura 11. Distribuição geográfica dos cães alvos de estudo no município de Lavras, MG.



Legenda: (A) Lavras e as cidades circunvizinhas que tiveram cães da pesquisa em destaque. (B) Cães diagnosticados pela Vigilância Ambiental de Lavras em 2017 e bairros dos cães da pesquisa demarcados.

Fonte: Google maps (2019); Adaptado de Blanco (2019).

Podemos notar pelo mapa que a pesquisa englobou cães de regiões diversificadas, inclusive de áreas onde a Vigilância Ambiental do município ainda não havia realizado inquérito epidemiológico até o ano de 2017.

5.2 Resultados laboratoriais

As quatro técnicas imunocromatográficas e o EIE foram realizados em todos os 52 cães amostrados. O PCR de medula óssea foi realizado em 50 cães, pois houve perda de duas amostras durante a realização da PCR, porém eles realizaram os outros exames do padrão de referência, obtendo resultado positivo. O exame parasitológico direto da medula óssea foi realizado em 48 cães, visto que as lâminas de quatro cães foram descartadas por falha na coloração. A PCR do “swab” conjuntival foi realizada em 35 cães, pelo fato desta técnica ter sido introduzida tardiamente no projeto. Os resultados de todas as técnicas para cada cão estão apresentados no Apêndice C e os resultados condensados por técnica estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultado das técnicas realizadas nos cães amostrados no município de Lavras e cidades circunvizinhas.

TÉCNICA	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
TR DPP® Ponta de orelha	37	15	52
TR DPP® Sangue venoso	38	14	52
TR rKDDR-plus	36	16	52
TR ALERE®	32	20	52
EIE rKDDR-plus	37	15	52
Parasitológico medula óssea	6	42	48
PCR medula óssea	46	4	50
PCR “swab” conjuntival	32	3	35

Nota: (TR) teste rápido, (EIE) ensaio imunoenzimático, (PCR) reação em cadeia da polimerase
 Fonte: Do autor (2019)

Após a realização de todos os testes laboratoriais, os animais foram classificados em cães infectados e não infectados, seguindo o padrão de referência estipulado (parasitológico direto, PCR da medula óssea e do “swab” conjuntival), para análise dos parâmetros avaliativos de teste diagnóstico.

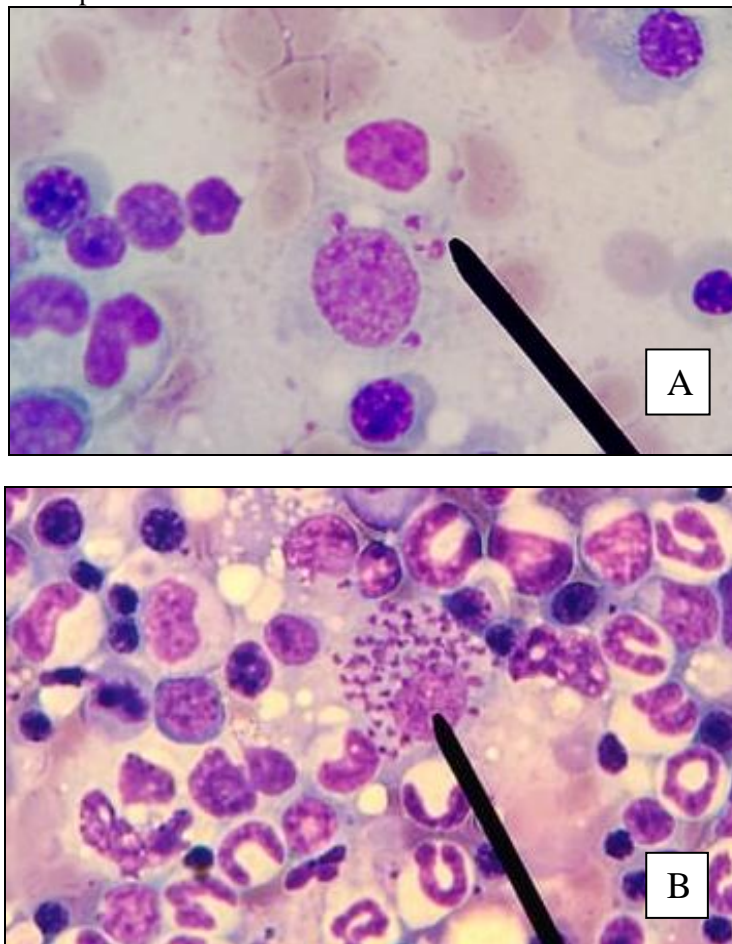
Foi possível verificar a presença de formas arredondadas, medindo aproximadamente 3,0 μm , com presença de núcleo e cinetoplasto, sendo compatíveis com amastigotas de *Leishmania* (Figura 12) em seis dos 51 esfregaços confeccionados a partir da medula óssea dos animais. Todas as amostras positivas no exame direto do esfregaço de medula óssea eram provenientes de animais que constituíam o grupo com cães encaminhados pela Vigilância Ambiental e eutanasiados no setor de Patologia Veterinária da UFLA.

A Figura 13 demonstra o gel de agarose com os resultados da PCR com kDNA como alvo e iniciadores específicos para o subgênero *Leishmania*, realizados com amostra de aspirado de medula óssea e “swab” conjuntival. Foram obtidos 46/50 resultados positivos para o aspirado de medula óssea e 32/35 para o “swab” conjuntival.

Dos 52 cães incluídos na presente amostra, 50 foram classificados como infectados e dois não infectados, de acordo com os resultados da composição dos testes padrão de referência. Estes dois últimos também apresentaram resultados negativados em todas as técnicas avaliadas. Os cães não infectados foram provenientes de casuística hospitalar. Eram cães de raça definida (Pug e Shitzu), idade de 4 e 5 anos, com presença de sinais clínicos compatíveis com LVC (escores 5 e 6 respectivamente), não vacinados, sem uso de coleira repelente e domiciliados em canil em quintal externo à residência. O tutor de um cão procurou o atendimento hospitalar por notar apatia no seu animal. Ao exame físico apresentou alopecia localizada, lesões descamativas, eritematosas e linfadenopatia. Foram investigadas dermatofitose, demodicose, alergia alimentar e leishmaniose como diagnóstico diferencial. Já o tutor do outro cão procurou o

hospital veterinário por suspeita de LVC pelo seu animal ter tido contato com o sêmen de outro cão que teve diagnóstico confirmado. Apresentava sinais de alopecia e emagrecimento. Havia feito ELISA anteriormente com resultado indeterminado.

Figura 12 - Resultados representativos do teste parasitológico direto utilizando aspirados medulares.



Legenda: As setas em (A) e (B) indicam formas arredondadas, contendo núcleo e cinetoplasto, compatíveis com amastigotas de *Leishmania* sp dentro de macrófagos em esfregaço confeccionado a partir de aspirado de medula óssea, corado pelo corante panótico em objetiva de 100 x.

Fonte: Do autor (2018).

Figura 13. Resultados da PCR convencional para as amostras de medula óssea e “swab” conjuntival de cães amostrados. (Continua)

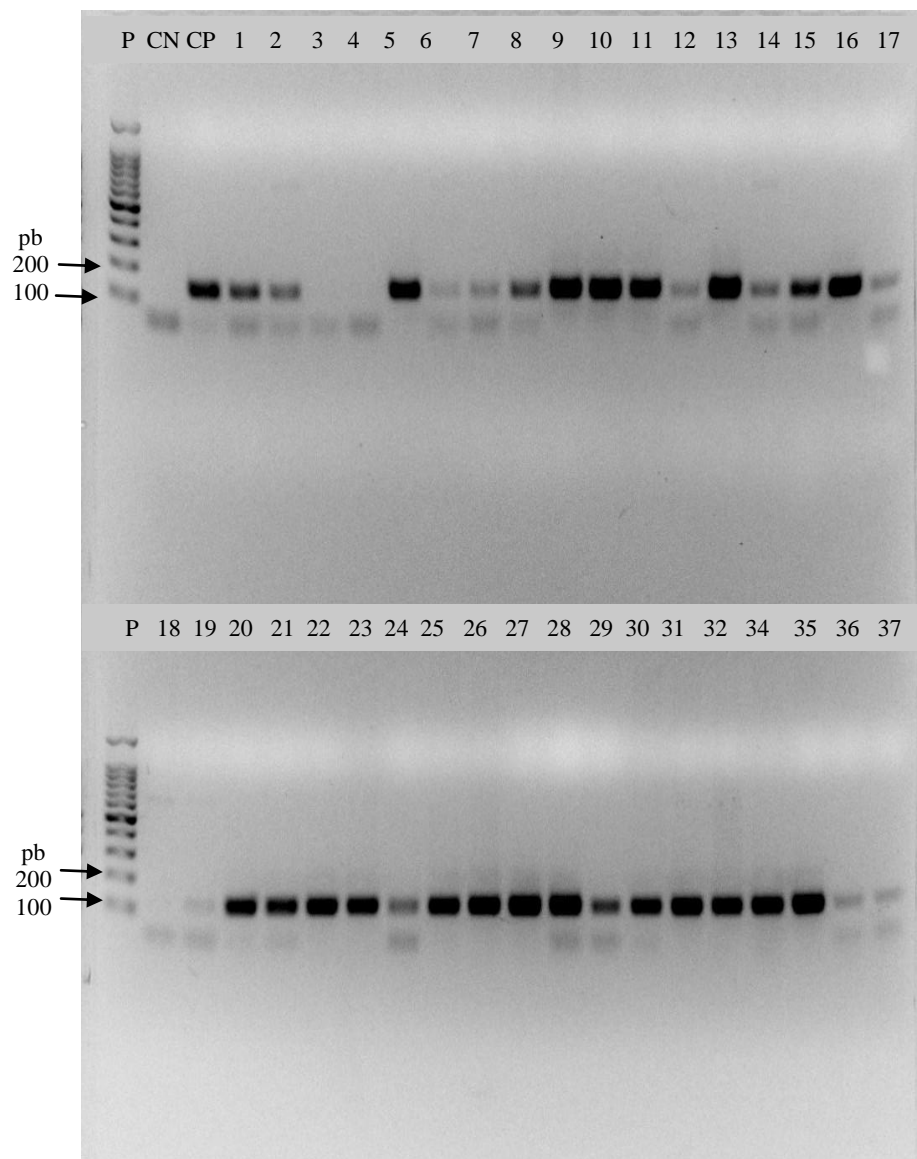


Figura 13. Resultados da PCR convencional para as amostras de medula óssea e “swab” conjuntival de cães amostrados. (Continua)

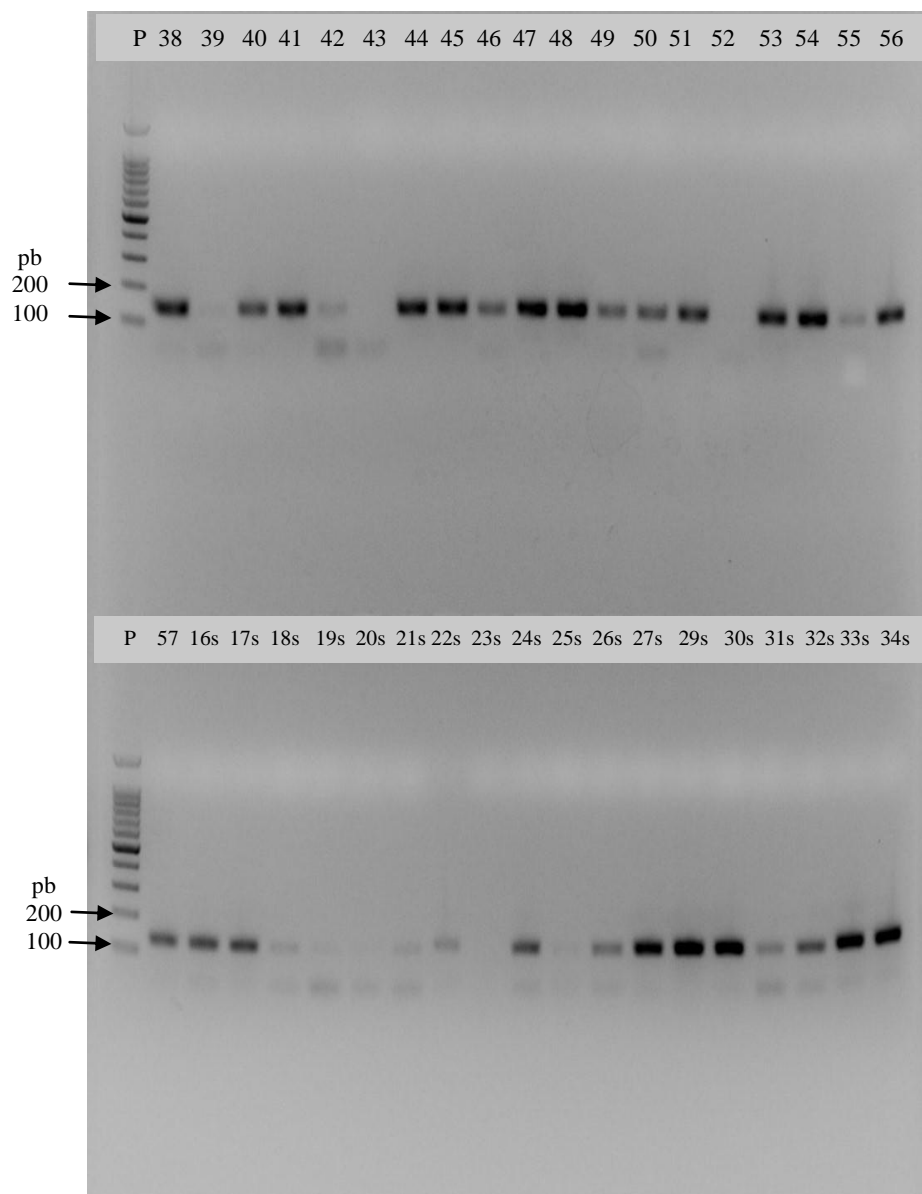
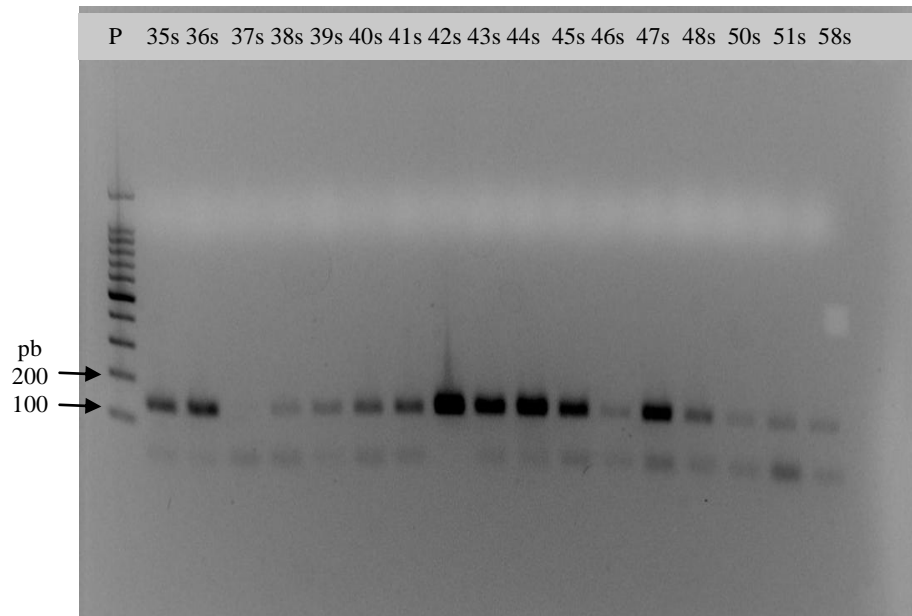


Figura 13. Resultados da PCR convencional para as amostras de medula óssea e “swab” conjuntival de cães amostrados. (Conclusão)



Legenda: (pb) pares de base, (P) padrão, (CN) controle negativo, (CP) controle positivo de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75). Canaletas de 1 a 51 (aspirado de medula óssea), 52 a 57 (linfonodo, fígado e baço de 2 cães), 16s a 58s (“swab” conjuntival).

* As bandas entre 200 e 100 pares de base representam a banda de *L. infantum*.

Fonte: Do autor (2019).

5.2.1 Avaliação da concordância de resultados do TR-DPP® a partir de amostras de diferentes sítios anatômicos do cão

Os principais parâmetros para avaliar o desempenho do TR-DPP® com amostras colhidas em dois sítios anatômicos diferentes estão representados na Tabela 7. A especificidade dos grupos com ausência de sinais clínicos (ASC) não pode ser avaliada, pois não houve nenhum cão não infectado sem sinal compatível com LVC. O TR DPP® com sangue venoso apresentou o maior valor de sensibilidade (76%) e acurácia (76,9%) em comparação ao colhido com

sangue total de ponta de orelha. Ambos apresentaram uma sensibilidade baixa nos animais ASC.

A análise de concordância e o resultado do teste de McNemar do TR-DPP® com as duas possibilidades de coleta em comparação ao padrão de referência estão apresentadas na Tabela 8. O teste apresentou uma concordância ruim, e o valor de $p < 0,05$ demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa entre a frequência absoluta de positividade entre o TR-DPP® e o padrão de referência quando analisado nos 52 cães. Já no grupo com a presença de sinais clínicos (PSC) a relação de concordância foi mais forte e não houve diferença significativa entre a frequência de positividade entre os testes.

O índice Kappa não pode ser avaliado no grupo ASC, visto que não houve presença de cães não infectados neste grupo. No entanto, o cálculo de McNemar foi feito e os dois testes obtiveram um valor de $p < 0,05$.

Tabela 7. Parâmetros para avaliação do TR DPP® para detecção de anticorpos contra *Leishmania infantum* com coleta em diferentes sítios anatômicos, em 52 cães do município de Lavras e cidades circunvizinhas.

TESTE	GRUPOS	SENS % (IC 95%)	ESPEC % (IC 95%)	AC %
TR DPP® PONTA DE ORELHA	GERAL (n=52)	74,0 (59,9-88,1)	100	75,0
	ASC (n=21)	47,6 (16,7-78,6)	-	47,6
	PSC(n=31)	93,1 (83,5-102,7)	100	93,5
TR DPP® VENOSO	GERAL (n=52)	76,0 (62,4-89,6)	100	76,9
	ASC (n=21)	52,4 (22,9-81,9)	-	52,4
	PSC(n=31)	93,1 (83,5-102,7)	100	93,5

Nota: (Sens) sensibilidade, (Espec) especificidade, (IC) intervalo de confiança, (AC) acurácia, (TR) teste rápido, (ASC) ausência de sinais clínicos, (PSC) presença de sinais clínicos.

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 8. Concordância e análise de frequência de positividade do TR DPP® para detecção de anticorpos contra *Leishmania infantum*, com coleta em diferentes sítios anatômicos, em 52 cães do município de Lavras e cidades circunvizinhas, em comparação ao padrão de referência.

TESTE	GRUPOS	KAPPA (IC 95%)	CONCORDÂNCIA	MCNEMAR (VALOR DE P)
TR DPP® PONTA DE ORELHA	GERAL (n=52)	0,180 (0,024-0,335)	Leve	0,0009
	PSC(n=31)	0,635 (0,308-0,963)	Substancial	0,4795
TR DPP® VENOSO	GERAL (n=52)	0,196 (0,034-0,357)	Leve	0,0015
	PSC(n=31)	0,635 (0,308-0,963)	Substancial	0,4795

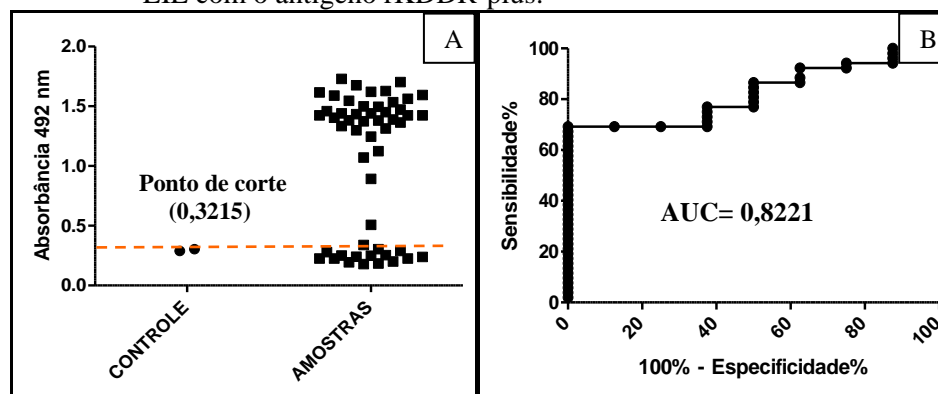
Nota: (IC) intervalo de confiança, (TR) teste rápido, (PSC) presença de sinais clínicos
Fonte: Do autor (2019).

5.2.2 Avaliação do desempenho da proteína rKDDR-plus

A proteína rKDDR-plus foi avaliada pela técnica de imunocromatografia e EIE. Esta última técnica teve seu ponto de corte calculado de acordo com a maior área sob a curva ROC (FIGURA 14).

Os principais parâmetros para avaliar o desempenho da proteína rKDDR-plus para o diagnóstico de LVC estão representadas na Tabela 9. Novamente a especificidade do grupo ASC não pode ser avaliada. A proteína apresentou melhor desempenho pelo EIE.

Figura 14. Distribuição de frequência e ponto de corte (A) e curva ROC (B) do EIE com o antígeno rKDDR-plus.



Legenda: (AUC) área sob a curva.

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 9. Parâmetros para avaliação da proteína rKDDR-plus para detecção de anticorpos contra *Leishmania infantum* por técnica imunocromatográfica e EIE em 52 cães do município de Lavras e cidades circunvizinhas.

TESTE	GRUPOS	SENS % (IC 95%)	ESPEC % (IC 95%)	AC%
TR rKDDR-PLUS	GERAL (n=52)	72,0 (57,3-86,7)	100	73,1
	ASC (n=21)	52,4 (22,9-81,9)	-	52,4
	PSC(n=31)	86,2 (72,7-99,7)	100	87,1
EIE rKDDR-PLUS	GERAL (n=52)	74,0 (59,9- 88,1)	100	75,0
	ASC (n=21)	57,1 (29,1-85,1)	-	57,1
	PSC(n=31)	86,2 (72,7-99,7)	100	87,1

Nota: (Sens) sensibilidade, (Espec) especificidade, (IC) intervalo de confiança, (AC) acurácia, (TR) teste rápido (ASC) ausência de sinais clínicos, (PSC) presença de sinais clínicos.

Fonte: Do autor (2019).

5.2.3 Análise do desempenho e concordância de resultados entre técnicas imunocromatográficas, imunoenzimáticas, parasitológicas e moleculares

Os principais parâmetros para avaliar o desempenho das diferentes técnicas utilizadas na pesquisa para o diagnóstico de LVC estão representados na Tabela 10. Dentre todas as técnicas imunocromatográficas o TR DPP® apresentou o maior valor de sensibilidade (76%) e acurácia (76,9%). Todos os testes sorológicos apresentaram valores baixos de sensibilidade quando avaliados no grupo ASC (42,9 a 57,1%) em comparação ao grupo PSC (79,3 a 93,1%). O exame parasitológico direto da medula óssea apresentou valores demasiadamente baixos de sensibilidade e acurácia em todos os grupos avaliados. As técnicas moleculares apresentaram valores elevados de sensibilidade e acurácia em todos os grupos avaliados e a PCR com amostra de aspirado de medula óssea apresentou valores maiores quando comparada à PCR com “swab” conjuntival.

A relação de concordância e valor de p pelo teste McNemar das técnicas estão demonstrados na Tabela 11. Todos os testes sorológicos apresentaram uma leve concordância quando analisados nos 52 cães, assim como todas as frequências absolutas de positividade entre os testes e o padrão de referência apresentaram diferença estatisticamente significativa. Ainda sobre os testes sorológicos, somente o TR DPP® apresentou uma maior concordância com o padrão de referência no grupo PSC. Neste mesmo grupo a frequência de positividade entre os testes e o padrão não obteve diferença significativa, exceto para o TR ALERE®.

Tabela 10. Parâmetros para avaliação do desempenho de várias técnicas para diagnóstico da Leishmaniose Visceral em 52 cães do município de Lavras e cidades circunvizinhas.

TESTE	GRUPOS	SENS % (IC 95%)	ESPEC % (IC 95%)	AC %
TR DPP®	GERAL (n=52)	76,0 (62,4-89,6)	100	76,9
	ASC (n=21)	52,4 (22,9-81,9)	-	52,4
	PSC(n=31)	93,1 (83,5-102,7)	100	93,5
TR rKDDR-PLUS	GERAL (n=52)	72,0 (57,3-86,7)	100	73,1
	ASC (n=21)	52,4 (22,9-81,9)	-	52,4
	PSC(n=31)	86,2 (72,7-99,7)	100	87,1
TR ALERE®	GERAL (n=52)	64,0 (47,4-80,6)	100	65,4
	ASC (n=21)	42,9 (10,5-75,2)	-	42,9
	PSC(n=31)	79,3 (62,8-95,9)	100	80,6
EIE rKDDR-PLUS	GERAL (n=52)	74,0 (59,9- 88,1)	100	75,0
	ASC (n=21)	57,1 (29,1-85,1)	-	57,1
	PSC(n=31)	86,2 (72,7-99,7)	100	87,1
PARASITOLÓGICO MEDULA ÓSSEA	GERAL (n=48)	13,0 (-13,9-40,0)	100	16,7
	ASC (n=21)	4,8 (-37,0-46,5)	-	4,8
	PSC(n=27)	20,0 (-15,1-55,1)	100	25,9
PCR MEDULA ÓSSEA	GERAL (n=50)	95,8 (90,1-101,6)	100	96,0
	ASC (n=20)	90,0 (76,1-103,9)	-	90,0
	PSC(n=30)	100,0	100	100
PCR “SWAB” CONJUNTIVAL	GERAL (n=35)	91,4 (81,7-101,1)	100	91,4
	ASC (n=16)	87,5 (70,2-104,8)	-	87,5
	PSC(n=19)	94,7 (84,4-105,1)	100	94,7

Nota: (Sens) sensibilidade, (Espec) especificidade, (IC) intervalo de confiança, (AC) acurácia, (TR) teste rápido, (PCR) reação em cadeia da polimerase, (ASC) ausência de sinais clínicos, (PSC) presença de sinais clínicos. Fonte: Do autor (2019).

Tabela 11. Concordância e análise de frequência de positividade entre os testes para diagnóstico da LVC e o padrão de referência.

TESTE	GRUPO	KAPPA (IC 95%)	CONCOR- DÂNCIA	MCNEMAR (VALOR DE P)
TR DPP®	GERAL (n=52)	0,196 (0,034 a 0,357)	Leve	0,0015
	PSC(n=31)	0,635 (0,308 a 0,963)	substancial	0,4795
TR rKDDR-PLUS	GERAL (n=52)	0,165 (0,016 a 0,315)	Leve	0,0005
	PSC(n=31)	0,446 (0,153 a 0,740)	Moderada	0,1336
TR ALERE®	GERAL (n=52)	0,120 (0,009 a 0,250)	Leve	0,0001
	PSC(n=31)	0,331 (0,069 a 0,593)	Justa	0,0412
ELISA rKDDR-PLUS	GERAL (n=52)	0,180 (0,024 a 0,335)	Leve	0,0009
	PSC(n=31)	0,446 (0,153 a 0,740)	Moderada	0,1336
PARASITOLÓGICO MEDULA ÓSSEA	GERAL (n=48)	0,015 (-0,034 a 0,063)	Leve	<0,0001
	PSC(n=27)	0,036 (-0,064 a 0,136)	Leve	<0,0001
PCR MEDULA ÓSSEA	GERAL (n=50)	0,648 (0,388 a 0,907)	Substancial	0,4795
	PSC(n=30)	1,00 (0,642 a 1,00)	Perfeita	-
PCR “SWAB” CONJUNTIVAL	GERAL (n=35)	-	-	0,2482
	PSC(n=19)	-	-	1,00

Nota: (IC) intervalo de confiança, (TR) teste rápido, (PCR) reação em cadeia da polimerase, (PSC) presença de sinais clínicos.

Fonte: Do autor (2019).

Dentre os testes que compuseram o padrão de referência, a PCR com a amostra de aspirado de medula óssea apresentou concordância substancial e quando avaliada apenas nos cães com PSC foi considerada perfeita. O valor de p pela fórmula de McNemar representou diferença estatisticamente significativa apenas no exame parasitológico direto, dentre os testes da composição do padrão de referência.

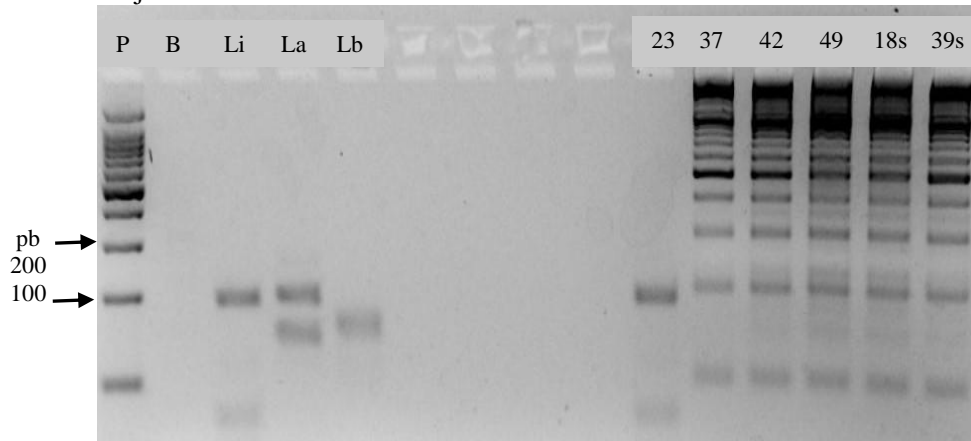
O índice kappa não pôde ser calculado para o grupo de animais com ASC, assim como para a PCR de amostra obtida pelo “swab” conjuntival, visto que estes não contemplavam os cães não infectados. O teste McNemar foi feito para o grupo com ASC e em todos os testes houve diferença estatisticamente significativa na frequência de positividade entre os testes e o padrão de referência, exceto para as técnicas moleculares, em que o valor de p obtido foi maior que 0,05.

Avaliando-se a possibilidade de realização de PCR de “swab” conjuntival seguido de PCR de medula óssea, a sensibilidade combinada foi calculada, obtendo um valor de 87,56% para os 52 cães, 94,70% no grupo PSC e 78,75% para o grupo ASC. Já com a realização dos testes em paralelo, obteve-se uma sensibilidade de 99,64% para os 52 cães, 100% no grupo PSC e 98,75% para o grupo ASC.

5.2.4 Identificação da espécie de *Leishmania*

Em função da quantidade de material genético disponível, foi possível realizar a PCR-RFLP (polimorfismo de fragmentos de DNA) em seis amostras positivas na PCR convencional, sendo quatro de medula óssea e duas de “swab” conjuntival. Essas seis amostras contemplaram todas que obtiveram resultado negativo na PCR feita com medula, mas positivo com a amostra de “swab” conjuntival, e algumas das que obtiveram resultados negativos em todos os testes sorológicos, mas positivo na PCR de medula. De acordo com a compatibilidade do padrão de banda apresentado na análise eletroforética do gel, foi possível verificar somente a espécie *L. infantum* em todas as amostras testadas (FIGURA 15).

Figura 15. Análise de RFLP de amplicons referentes a amostras de medula óssea e “swab” conjuntival de cães procedentes do município de Lavras, MG e cidades circunvizinhas, durante o período de agosto de 2018 a janeiro de 2019.



Legenda: (pb) pares de base, (P) padrão, (B) branco, (Li) *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), (La) *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), (Lb) *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903).

Fonte: Do autor (2019).

5.3 Primeiros casos notificados de LVC no município de Nepomuceno/MG

Dentre os cães da amostra estudada, três residentes do município de Nepomuceno/MG, cidade vizinha ao município de Lavras, foram diagnosticados com LV e confirmados com amostras enviadas ao laboratório público de referência do estado, FUNED (Fundação Ezequiel Dias). Os cães apresentaram resultado positivo em todos os testes realizados por este presente estudo, com exceção do parasitológico direto realizado com a punção aspirativa da medula óssea. A Vigilância Ambiental do município realizou TR DPP®, e no laboratório da FUNED foram realizados EIE do laboratório da Biomanguinhos, PCR convencional e RFLP de punção de medula óssea e linfonodo. Todos os resultados foram positivos e identificou-se a espécie *L. infantum* pela técnica RFLP.

Os cães apresentavam sinais clínicos de LV, como adenopatia linfoide, emagrecimento, alopecia, pelo opaco, úlceras, hiperqueratose, ceratoconjuntivite e onicogribose, com escore elevado (8 a 13), nunca foram vacinados contra LVC, nem faziam uso de coleiras repelentes para flebotomíneo. Residiam no centro do município, com proximidade de regiões de área verde, passavam a maior parte do tempo no quintal aberto da residência e tinham costume de sair sem a presença do tutor.

Dois destes cães foram eutanasiados e o laudo da necropsia revelou características consistentes do quadro de LV: mucosas conjuntivais e oral moderadamente pálidas; hipotricose, opacidade e descamações cutâneas generalizadas com alopecia na face, crostas em pinas e presença de úlceras; linfonodos superficiais muito aumentados de volume, ao corte amarronzados e suculentos; cavidade abdominal com pequena quantidade de líquido avermelhado translúcido; baço aumentado de volume, vermelho escuro, com cicatriz associada a esplenose em omento maior; fígado vermelho escuro, com espessamento capsular e com pequena quantidade de fibrina entre os lobos; rins discretamente pálidos; citologia de medula óssea (extremidade proximal do fêmur) revelou macrófagos com citoplasma repleto de formas amastigotas de *Leishmania* sp. A descrição histopatológica descreveu: pele com infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário multifocal a coalescente moderado em derme com macrófagos carregados de formas amastigotas de *Leishmania* sp., extensa área de ulceração com tecido degranulação subjacente; rim com espessamento discreto a moderado de membranas basais e cápsulas glomerulares, além de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intersticial multifocal; baço com hiperplasia linfoide difusa; fígado com congestão moderada, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário discreto em espaço porta; linfonodos com hemossiderose moderada. O patologista concluiu o diagnóstico de Leishmaniose em ambos animais.

Os cães foram notificados aos órgãos competentes de vigilância ambiental como sendo os primeiros casos autóctones de LVC do município de Nepomuceno.

6. DISCUSSÃO

O correto diagnóstico da LVC é fundamental para a adoção de medidas preventivas e de controle como a vacinação, a eutanásia e o tratamento do cão. As políticas públicas de controle direcionadas para cada município vão variar de acordo com a classificação que cada um recebe pelo número de casos notificados, fato que também depende de um correto diagnóstico.

No presente estudo o diagnóstico da LVC se fundamentou através da detecção do parasito em diferentes técnicas que compuseram um de padrão de referência rigoroso, o que confere melhor fidedignidade de resultado. Assim, através do diagnóstico adotado, pode-se avaliar características dos cães amostrados e a eficácia das diferentes técnicas de diagnóstico laboratorial.

Avaliando-se as características da amostra estudada, percebe-se algumas semelhanças relatadas por outros autores da população de cães com LV. O presente estudo apresentou em sua maioria cães adulto-jovens (40,38%), sendo que dentre os cães em que foi possível detectar a idade, representaram 55,26% dos cães infectados. Um estudo que envolveu 1823 cães, realizado em Lisboa, Portugal, por Abranches e colaboradores (1991), demonstrou maior prevalência em cães adulto-jovens (1 a 3 anos) e idosos (maiores de 8 anos). Com relação ao quadro clínico, no presente estudo, 42% dos cães infectados e em torno de 48% dos soropositivos não apresentavam sinais clínicos evidentes de LV. No mesmo estudo realizado em Portugal, 53,8% dos cães com títulos de anticorpos significativos nos testes sorológicos não apresentaram sinais clínicos.

A adoção de um escore para a classificação de grupos em animais com ou sem sinais clínicos auxilia a reduzir a subjetividade na classificação, aumentando a fidedignidade dos grupos. No presente estudo foram adotados apenas os sinais observados fisicamente para a avaliação clínica, pois estes são os sinais perceptíveis ao tutor do cão. Assim, se o animal não apresenta sinal

clínico, o tutor não busca atendimento médico veterinário. Outros estudos também adotaram a classificação em grupos apenas avaliando-se os sinais físicos compatíveis com a LVC (QUINNELL et. al, 2001; GRIMALDI et al., 2012; LAURENTI et al., 2014; BORJA et al., 2018).

Os principais sinais clínicos relatados no grupo amostral como a alopecia e hiperqueratose, corroboram com o quadro clínico de lesões dermatológicas apresentado em cerca de 90% dos cães sintomáticos (FERRER et al., 1988). A hiperqueratose é provocada pelo excesso da produção de queratina e a alopecia geralmente é provocada pela ação direta do parasito no folículo piloso, ou pela deposição de imunocomplexos na membrana basal da pele, induzindo uma reação auto-imune ou ainda por distúrbios do metabolismo do ácido pantotênico (vitamina que fortalece os folículos pilosos) devido às lesões hepáticas causadas pela infecção (HOMMEL, 1978). A alopecia expõe grandes áreas da pele extensamente parasitadas, facilitando a possibilidade de transmissão (BRASIL, 2014). As lesões dermatológicas geralmente surgem após o aparecimento da linfadenopatia, também presente em 42,31% dos cães da pesquisa, que é um dos sinais clínicos mais precoces e mais comuns da doença (RIBEIRO et al., 2018). Lombardo e colaboradores (2012) demonstraram a forte presença da linfadenopatia em cães com LV em um estudo com 173 cães de uma área endêmica nas províncias da Sicília. Este sintoma é decorrente da hiperplasia do linfonodo devido à proliferação do parasito e destruição de células do sistema mononuclear fagocitário, como os macrófagos.

Por se tratar de um estudo transversal, não foi possível fazer inferência sobre o período de infecção e a eficácia da vacinação, assim como sobre o uso de coleira com repelentes nos cães amostrados. No entanto, é preocupante o fato de que apenas 40% dos cães infectados faziam uso de coleira, visto estes podem estar contribuindo para o ciclo de transmissão do parasito.

No presente trabalho os cães parasitados eram em sua maioria machos (54%), mantidos em área externa da casa (67,57%) e com área verde próxima (60%). Esses dados corroboram com a conclusão de um estudo de revisão sistemática e meta-análise feito por Belo e colaboradores (2013) que demonstraram associação significativa de variáveis com a infecção de LVC como a pelagem curta, restrição peri-doméstica e presença de áreas verdes adjacentes ao domicílio. Os cães mantidos em área externa ao domicílio podem estar mais propensos ao repasto sanguíneo dos flebotomíneos, principalmente no período crepuscular, e as áreas verdes proximais são ambientes propícios para a reprodução do vetor, quando associadas à presença rica de matéria orgânica.

Ao avaliar a concordância de resultados utilizando coletas em diferentes sítios anatômicos para a realização do TR DPP®, o teste feito com a punção de sangue venoso apresentou sensibilidade e acurácia maior quando comparado ao teste realizado com a amostra de sangue total obtido na ponta da orelha. No entanto, essa diferença no valor da sensibilidade não gerou diferença entre as concordâncias com o padrão de referência, que foi considerada uma concordância leve para ambos. Schubach (2011) também demonstrou em seu estudo que o DPP® com sangue total de ponta de orelha e com soro não apresentaram diferenças significativas em relação aos parâmetros de sensibilidade e especificidade, o que o qualifica para uso tanto em campo quanto sob condições laboratoriais. O manual de utilização e orientações técnicas do TR DPP® aborda que não há diferença significativa de resultados utilizando-se sangue total, plasma ou soro. Porém não aborda sobre o resultado obtendo-se o sangue total em diferentes locais de coleta (BRASIL, 2016b). Assim, o resultado do presente estudo demonstra que a técnica realizada com a coleta de sangue venoso é mais sensível, mas apresenta o mesmo grau de concordância que a técnica realizada pelo sangue total colhido com a lanceta da ponta da orelha do cão. Supõe-se que a técnica com coleta obtida pela ponta da orelha pode ter seu

resultado afetado pela presença de lesões purulentas, advindas de infecções secundárias no local. Nesse caso, outros locais de coleta devem ser preferidos, como a cauda e patas.

Ao avaliar o desempenho da proteína rKDDR-plus, os valores de sensibilidade e acurácia do TR e EIE foram insatisfatórios, com baixa concordância em relação ao padrão de referência. Resultados melhores foram obtidos no grupo com sinais clínicos, no entanto, a concordância ainda foi considerada moderada. Siqueira (2018) também avaliou a eficácia do TR e EIE com a proteína rKDDR-plus para o diagnóstico da LVC. Na análise do EIE os cães selecionados não foram avaliados quanto ao estado clínico, já para a avaliação da imunocromatografia, houve esta segregação. Foram obtidos valores elevados para sensibilidade (96,67%) e acurácia (97,22%) do EIE, com uma concordância excelente com o padrão. Porém a sensibilidade do TR foi considerada insatisfatória (59,5%), com uma concordância moderada pela mesma escala utilizada pelo Kappa, com uma baixa porcentagem de acertos (26,32%) no grupo de cães assintomáticos (n=19) corroborando com os resultados apresentados no presente estudo. O diferencial em relação ao presente estudo é que no estudo de Siqueira, as amostras foram obtidas de banco de soros, onde já se havia um conhecimento prévio dos resultados (validação intrínseca), diferentemente do presente estudo, em que não houve rastreamento da amostra e os resultados dos verdadeiros positivos e negativos foram obtidos, após a aplicação dos testes da composição do padrão de referência, caracterizando uma metodologia exploratória (validação extrínseca).

Avaliando-se o desempenho das diferentes técnicas na amostra estudada, o TR DPP® apresentou maior valor de sensibilidade e acurácia dentre os demais TR. O TR ALERE® apresentou os menores valores de sensibilidade, acurácia e a menor concordância no grupo com sinais clínicos, apresentando diferença estatisticamente significativa entre a frequência de positividade com os

resultados do padrão de referência. Siqueira (2018) também demonstrou sensibilidade (46,8%) baixa para o TR ALERE®. Este dado apresentado pelo presente estudo é preocupante, visto que este teste comercial é o recomendado e regulamentado para uso na ausência do fornecimento do DPP® aos órgãos públicos responsáveis pelo controle da LVC. (FUNED 2015).

Verifica-se que os TR fornecem dados heterogêneos. É preciso cuidado e rigor na escolha de um TR para triagem. No geral, a sensibilidade de todos os TR imunocromatográficos testados foi considerada baixa. Quando um teste de triagem apresenta valor relativamente baixo de sensibilidade, o número de resultados falso negativo se torna elevado, sendo que o ideal é que o teste de triagem seja capaz de detectar todos os casos da doença (BASTOS; BASTOS, 2004; FRANCO; PASSOS, 2005).

Quando avaliada a sensibilidade em grupos separados pelos sinais clínicos, o desempenho é ainda menor nos cães sem sinais clínicos, apresentando média de 48,83% de acurácia diferentemente do grupo com sinais clínicos que apresentou 88,68%. Mais da metade dos cães infectados sem sinais clínicos característicos da LV deixaram de ser detectados pelos TR. Este fato é bastante relevante visto que os cães sem sinais clínicos também podem apresentar elevada transmissibilidade, indicando seu papel na manutenção e disseminação do parasito em áreas endêmicas (LAURENTI et al., 2013), apesar de que a maior parte dos estudos sugere que apenas uma pequena proporção de cães com infecção sintomática e carga parasitária elevada na pele é responsável pela maioria dos eventos de transmissão para flebotomíneos (COURTENAY et. al, 2002; COURTENAY et. al, 2014). Assim, não existe um consenso sobre a relevância exata do quadro clínico no ciclo de transmissão do parasito, sendo prudente considerar que cães com a presença ou ausência de sinais clínicos possam ser considerados fonte de infecção para vetores e que ambos devam ser diagnosticados corretamente para que a real prevalência da infecção seja

considerada para a adoção de medidas de controle pelas políticas públicas (RIBEIRO et al., 2018).

Não podemos inferir que um cão infectado está doente. Em vias de regra, os cães assintomáticos estariam parasitados, mas podem ainda não ter desenvolvido a doença. Em áreas endêmicas para a LVC a prevalência de infecção é maior que a doença, e a presença de grupo de cães infectados soronegativos é relativamente frequente (SOLANO-GALLEGO et al, 2001). Mas estes cães infectados não-doentes podem permanecer como um reservatório, perpetuando o ciclo, e/ou evoluir para um quadro clínico da LV.

Peixoto, Oliveira e Romero (2015) ao realizarem uma revisão sistemática e meta análise com artigos publicados até fevereiro de 2013 sobre diagnóstico sorológico para LVC demonstraram que os valores para sensibilidade encontrados nos artigos foram de 83,5% para o DPP®, sendo este valor superior ao encontrado no presente estudo (76%). Dentre os problemas metodológicos identificados nesse estudo de revisão, relatou-se que a maioria utilizou cães previamente rastreados em relação à presença ou ausência da infecção, através de outros testes sorológicos, superestimando a acurácia dos testes. O que difere destes estudos para a presente pesquisa é a utilização dos testes moleculares para a classificação dos cães em verdadeiro positivo e verdadeiro negativo. Quando se utiliza outro teste sorológico como padrão-ouro para avaliação do desempenho do DPP®, para que ocorra uma positividade, é necessária uma soroconversão no cão, que pode demorar de 3 a 5 meses em média, podendo gerar um falso negativo caso o animal não tenha produzido anticorpos detectáveis ou ainda em casos de anergia ou imunossupressão, mesmo que ele já esteja infectado (MORENO; ALVAR, 2002).

Um importante desafio para os estudos de validação de teste diagnóstico para a LVC é a definição do padrão de referência. Tradicionalmente as técnicas parasitológicas foram empregadas, mas a partir do surgimento das

técnicas moleculares, houve a detecção de infecção em animais que ainda não tinham sido diagnosticados pela parasitologia e sorologia. Assim, desde que utilizados com amostras adequadas, iniciadores bem desenhados e metodologia padronizada, podem ser utilizados para composição do padrão de referência, podendo superar as limitações do diagnóstico sorológico e parasitológico. O teste molecular se torna mais eficaz devido à amplificação do DNA, que aumenta drasticamente a sua sensibilidade analítica, podendo detectar quantidades ínfimas do parasito (OLIVEIRA, 2005). Essa foi a razão da escolha de testes moleculares na composição do padrão de referência da presente pesquisa. Estudos anteriores demonstraram um limite de detecção de 100 fentogramas de DNA genômico do parasita com a utilização do mesmo iniciador e padronização de técnica utilizada no presente estudo, podendo detectar fases iniciais da infecção (CARDOSO et al., 2019).

Assim como a presente pesquisa, Lopes e colaboradores (2017), utilizaram testes moleculares como padrão de referência (PCR com amostras de sangue, linfonodos, e “swab” conjuntival) e compararam com os resultados do DPP® em 975 cães de uma região endêmica, concluindo que um em cada cinco cães soronegativos estão infectados. Esse resultado corrobora com o presente estudo, onde pode-se verificar que os TR deixaram de detectar em média de 27,4% dos cães infectados. Teixeira e colaboradores (2019), que também incluíram testes moleculares como padrão de referência, encontraram valores demasiadamente baixos de sensibilidade em vários testes sorológicos, como DPP® (21,74%), EIE da Biomanguinhos (11,59%), ELISA rK39 (37,68%).

Os valores de especificidade de 100% alcançados por todos os testes sorológicos avaliados no presente estudo, indicam que nenhum cão foi detectado como falso positivo, o que é fundamental, principalmente nos cães que já haviam sido eutanasiados. Porém, não podemos avaliar este parâmetro de forma fidedigna devido ao baixo número de verdadeiros negativos na amostragem. O

quantitativo de verdadeiros negativos não influencia nos valores de sensibilidade do teste, e em se tratando da avaliação do desempenho de testes de triagem, como os imunocromatográficos, a sensibilidade é o melhor parâmetro, visto que a intenção destes testes é a de que todos os verdadeiros positivos sejam detectados e o mínimo de resultado falso negativo seja gerado (BASTOS; BASTOS, 2004; FRANCO; PASSOS, 2005).

No presente estudo foi avaliado o desempenho separadamente de cada técnica que compôs o padrão de referência proposto. Os resultados foram úteis para justificar a utilização de mais de uma técnica como padrão-ouro. Caso fosse utilizado apenas a técnica parasitológica como padrão-ouro, mais de 80% dos cães infectados não teriam sido diagnosticados. A combinação de duas amostras diferentes para a realização da PCR aumentou a sensibilidade da composição do padrão de referência, visto que alguns cães obtiveram resultados negativados pela PCR com o aspirado de medula óssea, mas positivados pelo “swab” conjuntival. Isso pode acontecer devido à dificuldade de se fazer a coleta de medula óssea, onde a aspiração pode vir acompanhada de grande volume sanguíneo, influenciando na quantificação de DNA extraído, visto que estudos já demonstraram baixa sensibilidade da PCR realizada com amostra de sangue (QUARESMA et al., 2009).

Apesar da PCR com a amostra de medula ter sido mais sensível de acordo com os resultados da presente pesquisa, esta exige uma coleta mais invasiva, além de exigir um profissional experiente. O uso da sedação para imobilização do animal é um procedimento que nem sempre é utilizado na rotina, mas quando utilizado torna a coleta ainda mais complexa devido ao uso de medicamentos anestésicos que podem oferecer risco ao animal. Esta é uma limitação para o uso em campo e em inquéritos epidemiológicos.

Em contrapartida, a coleta de células da mucosa conjuntival não é um processo invasivo, podendo ser executada facilmente em campo e a presente

pesquisa demonstrou valores mais elevados de sensibilidade, quando comparados aos testes sorológicos, não havendo diferença estatística significativa quanto à frequência de positividade dos resultados do padrão de referência, mesmo no grupo com ausência de sinais clínicos. Lombardo e colaboradores (2012) também apresentaram resultados satisfatórios de acurácia diagnóstica da PCR com “swab” conjuntival, corroborando com os resultados da presente pesquisa. Ferreira e colaboradores (2012), em pesquisa realizada com 80 cães naturalmente infectados por *L. infantum*, obtiveram maiores taxas de resultados positivos pelo “swab” conjuntival quando comparados aos resultados com amostra de sangue e aspirado de medula óssea, e concluíram que o “swab” conjuntival é uma amostra clínica adequada para o diagnóstico molecular qualitativo da LVC independente do estado clínico do cão.

A utilização da PCR com “swab” conjuntival como teste de triagem pode ser uma alternativa para diagnóstico no grupo de animais sem sinais clínicos de LV ao uso de métodos sorológicos, que são as técnicas preconizadas pelo MS atualmente. Uma das limitações do seu uso é o elevado custo, o que poderia inviabilizar a utilização em larga escala. Porém, a adoção desta técnica pode ter utilidade para evitar alocação de cães infectados soronegativos para áreas não endêmicas para a LVC (BANETH et al, 2008).

A partir dos resultados obtidos, nosso grupo de pesquisa pode dar continuidade a fim de se conhecer a prevalência da infecção da LVC canina em Lavras e sua microrregião, em um quantitativo amostral maior, através do uso da PCR por “swab” conjuntival, visto às limitações e dificuldades da coleta do aspirado de medula óssea. Outras pesquisas relacionadas à eficácia do uso de colares repelentes, vacinação, tratamento, compreensão da dinâmica da transmissão através de xenodiagnóstico para verificação da infecciosidade de cães soronegativos infectados, também poderão aderir aos testes moleculares não invasivos para seleção de sua amostragem.

Sugerimos que os cães considerados infectados, mas soronegativos devam ser monitorados com realização de subsequentes testes laboratoriais e enfatizamos que o uso do colar repelente é indicado a todos os cães, independente da sua condição de infectado, doente ou não infectado em áreas enzoóticas. Repelentes para flebotômíneos de uso tópico também podem ser uma opção de medida preventiva para evitar propagação do parasito. Ainda são necessárias novas pesquisas com xenodiagnóstico e/ou marcadores específicos e sensíveis de infecciosidade para averiguar o verdadeiro papel destes cães na transmissão aos vetores. A adoção da eutanásia, que é uma das medidas de controle preconizada pelos órgãos públicos, deve ser utilizada com cautela, visto que no Brasil, é indicada aos animais sororreagentes e/ou parasitológico positivo, caso o tutor não opte pelo tratamento (BRASIL, 2014). O tratamento nos cães deste grupo também deve ser avaliado com cautela, visto que não existem evidências consolidadas de cura parasitológica com o uso da miltefosina (MILTEFORAN, 2018). Assim, não faria sentido tratar um cão assintomático com baixa carga parasitária, exceto nos casos em que a carga parasitária aumentasse ao longo do acompanhamento do animal, ou caso o cão apresentasse quadro patológico da LVC, mesmo sem a presença de sinal clínico externo.

Nossos resultados foram encaminhados à Vigilância Ambiental do município de Lavras, e acrescentam dados fundamentais a serem incorporados às políticas de controle da LVC para toda a microrregião. Até o ano de 2013, Lavras era considerada uma área silenciosa e não vulnerável para LV. No entanto, Soares e colaboradores, em 2014, realizaram uma triagem em um abrigo de cães, encontrando 20% de taxa de soropositividade. Narciso (2016) relatou o primeiro caso de infecção canina pela espécie *L. infantum* no município e avaliou a técnica de ELISA com a proteína rKDDR, precursora da rKDDR-plus, encontrando um valor de sensibilidade de 88,54%. Porém, o estudo não teve resultados da sensibilidade nos cães segregados por sinal clínico.

Assim, este é o primeiro estudo exploratório de avaliação extrínseca de testes para diagnóstico da LVC no município de Lavras, e que teve técnicas moleculares como padrão de referência.

Esta pesquisa também relatou o primeiro caso canino confirmado e notificado de LV no município de Nepomuceno, vizinho ao território de Lavras, demonstrando a expansão da doença com casos notificados e amostrados, como os municípios de Campo Belo, Ijaci e Ribeirão Vermelho.

A identificação da espécie pelo polimorfismo de fragmentos de DNA encontrou apenas *L. infantum* nas amostras selecionadas (amostras que apresentaram resultado positivo na PCR com “swab” conjuntival, mas negativo com amostra de medula). Essa identificação foi fundamental para excluir a possibilidade dos cães estarem parasitados por outras espécies do subgênero *Leishmania*, visto que a PCR com o primer kDNA detecta material apenas deste subgênero. Os cães que tiveram resultado positivo para PCR com a amostra de medula óssea não foram incluídos para identificação de espécie por ser mais provável que seja a espécie *L. infantum* presente neste tipo de amostra e pelo iniciador utilizado na PCR ser específico para o subgênero *Leishmania*. No entanto, isto não pode ser afirmado, visto que alguns estudos relatam a possível visceralização de outra espécie do subgênero *Leishmania* em linfonodo, a *L. (Leishmania) amazonensis* (TOLEZANO et al., 2007).

7. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

- A amostra estudada apresentou 96,15% dos cães com diagnóstico confirmado para LVC, com as principais características e hábitos em sua maioria: sexo masculino, idade adulto-jovem, mantidos em área externa da casa e com área verde próxima, 58% com sinais clínicos presentes sendo a opacificação do pelo, alopecia, linfadenopatia e hiperqueratose os mais presentes.

- As medidas de profilaxia e controle adotadas nos cães amostrados foram: 38,46% faziam uso de colares repelentes e apenas 3,85% foram vacinados.

- O sangue venoso parece ser a melhor amostra para o TR DPP® em comparação ao sangue total de ponta de orelha.

- O TR e ELISA com a proteína rKDDR-plus demonstrou resultados satisfatórios apenas nos cães com presença de sinais clínicos.

- Os testes imunocromatográficos apresentaram resultados insatisfatórios de sensibilidade para serem enquadrados como testes de triagem, principalmente nos cães sem sinais clínicos.

- O desempenho da PCR com “swab” conjuntival o torna como ferramenta diagnóstica auxiliar robusta para a LVC e sugere-se que seja utilizada como teste de triagem em cães sem sinais clínicos.

- Apenas a espécie *L. infantum* foi encontrada nos cães avaliados.

Os resultados obtidos reforçam as preocupações com o uso de testes sorológicos para identificar cães sem sinais clínicos, considerando que esta metodologia é a principal ferramenta utilizada para controle da LVC. Com base

neste trabalho, reforça-se a necessidade de aperfeiçoamento dos testes de triagem para auxiliar na resolução diagnóstica e nas medidas de controle.

REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, P. et al. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **The Journal of Parasitology**, v. 77, n. 4, p. 557-561, Aug, 1991.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v. 7, n. 5, e35671, May, 2012.
- BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, Oxford, UK, v. 24, n.7, p. 324–30, May, 2008.
- BASTOS, R. R.; BASTOS, R. R. Sensibilidade e especificidade. Curso Continuo de Bioestatística e Epidemiologia. **Revista Médica Oficial do Hospital Universitário da UFJF**, v. 30, n. 1, p. 48-51, Jan-Abr, 2004.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, Aug, 2007.
- BELO, V. S. et al. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1-2, p. 1-13, Mar, 2013.
- BERTOLO, D.M.B. **Aspectos soroepidemiológicos da leishmaniose visceral no Departamento Regional de Saúde (DRS) XV região de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil, 2008 - 2012**. 2016. 155 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2016.
- BLANCO, Y. A. C. **Identification and observational epidemiological study of flebotomine fauna (Diptera:Psychodidae: Flebotominae) in the transmission area of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Lavras, Minas Gerais, Brazil**. 2019. 60 P. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.
- BORJA, L. S. et al. High accuracy of an ELISA test based in a flagella antigen of *Leishmania* in serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis with potential to improve the control measures in Brazil – A Phase II study. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 10, e0006871, Oct, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **Ensaio imunoenzimático (EIE) para diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **DATASUS.** Brasil, Minas Gerais: Informações de Saúde, 2009. Atualizado em 14/12/2009. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/tabdata/cadernos/mg.htm>. Acesso em 12/04/2019

BRASIL. Ministério da Saúde. **DATASUS.** Brasil, Minas Gerais: Informações de Saúde, 2010. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?ibge/censo/cnv/escbmg.def>. Acesso em: 12/04/2019

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde,** 1. ed. atual. – Brasília : Ministério da Saúde, 2016a. 773 p. Disponível em: <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/18/Guia-LV-2016.pdf> . Acesso em: 24/02/2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina: Manual de utilização e orientações técnicas.** Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro. 2016b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção.** Nota Informativa: Informa sobre o tratamento de cães com leishmaniose visceral e sua implicação nas ações de vigilância e controle dessa doença em humanos. setembro de 2016c. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/setembro/23/NT-informativa-Milteforan--002-...pdf> . Acesso em: 12/04/2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. **Leishmaniose visceral 2017,** outubro de 2017. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/leishvisceral-17-novo-layout.pdf>. Acesso em: 24/02/2019

BRASIL. Ministério da Saúde. **DATASUS**. Brasil, Minas Gerais: Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net; 2019. Atualizado em 04/02/2019. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvmg.def>. Acesso em: 08/042019

CARDOSO, M. S. et al. Detection of multiple circulating *Leishmania* species in *Lutzomyia longipalpis* in the city of Governador Valadares, southeastern Brazil. **Plos One**, v. 14, n. 2, e0211831, Feb, 2019.

COURA-VITAL, W. et al. Evaluation of changes in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new protocol for diagnosis. **Plos One**, v. 9, n. 3, :e91009, Mar, 2014.

COURTENAY, O. et al. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314-1320, Nov, 2002.

COURTENAY, O. et al. Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, e2583, Jan, 2014.

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, p.139-146, 2007.

DE CASTRO, J. C. **Investigação da fauna flebotômica e sua infecção natural por *Leishmania* spp., no município de Lavras, MG, Brasil**. 2017. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P. M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 11, p. 524-530, Nov, 2004.

FERREIRA, S. A. et al. Canine skin and conjunctival swab Samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, e1596, 2012.

FERRER, L. et al. Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29, n. 6, p. 381-388, June, 1988.

FRAGA, D.B.M. et al. The Rapid Test Based on *Leishmania infantum* Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n.1, e0004333, 2016.

FRANCO, L. J.; PASSOS, A. D. C. **Fundamentos de Epidemiologia**. Ed. Manole, Barueri, SP, p.151-64, 2005.

FUNED. FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS - Instituto Octávio Magalhães (Lacen-MG) – Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças - Serviço de Doenças Parasitárias. **Instruções para a realização do teste rápido imunocromatográfico Alere para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina**. 2015.

GALLUZZI et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 11, n.273, May, 2018.

GRIMALDI, G. J. 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. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54–59, Jan, 2012.

GRYNPAS, M. D. et al. Changes in bone mineralization, architecture and mechanical properties due to long-term (1 year) administration of pamidronate (APD) to adult dogs. **Osteoporosis International**, v. 2, n. 2, p. 74-81, Mar, 1992.

GUIMARÃES, VC. et al. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasites & Vectors**, v.9, n.159, Mar, 2016.

HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403-409, Sep, 2011.

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

HOMMEL, M. The genus *Leishmania*: Biology of the parasites and clinical aspects. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, Paris, v. 76, n.1, p. 5-102, 1978.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades, 2017 versão 4.3.17.1** Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/lavras/panorama>. Acesso em: 05/03/2019

JAPOLLA, G. A. et al. Teste imunocromatográfico de fluxo lateral: uma ferramenta rápida de diagnóstico. **Enciclopédia Biosfera**. p. 2635-2649, 2015.

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 of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 105, n. 8, p. 559-565, Dec, 2011.

KRAWCZAK, F. S. et al. *Leishmania*, *Babesia* and *Ehrlichia* in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 64-68, Jan-Fev, 2015.

LACHAUD, L. et al. 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n.1, p. 210-215, Jan, 2002.

LAINSON, R.; RANGEL E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, Dec, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 273, n. 5664, p. 595-600, June, 1978.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-174, Mar, 1977.

LAURENTI, M. D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania* (*Leishmania*) infantum to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 296-300, Sep, 2013.

LAURENTI, M. D. et al. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3-4, p. 444-450, Oct, 2014.

LAVRAS. Prefeitura Municipal. Vigilância Ambiental e Epidemiológica. **Inquéritos de Leishmaniose Visceral Canina**, 2019.

LEMOS, L. C. D. **Expressão Heteróloga da rKDDR de *Leishmania infantum***: um novo antígeno recombinante para o diagnóstico da leishmaniose visceral. 2014. 81 p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

LOMBARDO, G. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 1, p. 10-17, Feb, 2012.

LOPES, E. G. et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 12, p. 2436-2444, Sep, 2017.

LOPEZ-VELEZ, R. et al. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 436-443, Apr, 1998.

LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, May, 2007.

MACHADO, C. J. S.; SILVA, E. G.; VILANI, R. M. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. **Saúde e Sociedade**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 247-258, Mar, 2016.

MILES, M.A. et al. Canine leishmaniasis in Latin América: control strategies for visceral leishmaniasis. In: KENDRICK, K. Canine Leishmaniasis: an update. **Hoechst Roussel Veterinary**. p. 46-53, 1999.

MILTEFORAN: miltefosina 20 mg/ml. Virbac, [2018]. Bula de remédio

MOREIRA, E. D. J. et al. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 245-252, Aug, 2004.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitology**, v. 8, n.9, p.399-495, 2002.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, Oct, 2005.

NARCISO, T.P. **Investigação do estado da leishmaniose visceral canina no município de Lavras – MG**. 2016. 43 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

OLIVEIRA, J.G.S. et al. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 94, p 55-59, 2005.

OVALLOS, F. G. **Estudo da capacidade vetorial de *Migonemyia migonei* (França) e de *Pintomya fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* Cunha & Chagas**, 2011, 106 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PALTRINIERI, S. et al. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, v.45, n.4, p;552-78, 2016.

PAPARCONE, R. et al. Sternal Aspiration of Bone Marrow in Dogs: A Practical Approach for Canine Leishmaniasis Diagnosis and Monitoring, **Journal of Veterinary Medicine**, v. 2013:217314, p.1-4, 2013.

PEIXOTO, H. M.; OLIVEIRA, M. R. F.; ROMERO, G. A. S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine and International Health**, v.20, n.3, p.334-52, 2015.

PILATTI, M.M. et al. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. **Research in Veterinary Science**, v.87, n.2, p.255-57, 2009.

QUINNELL, R.J., et al. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v.122, p.253-61, 2001.

RIBEIRO, R. R. et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v. 2018: 3296893, p.1-12, 2018.

SANTOS, M. F. et al. Genetic structure of *Lutzomyia longipalpis* populations in Mato Grosso Do Sul, Brazil, based on microsatellite markers. **PLoS One**, v.8, n.9 : e74268, 2018.

SCHUBACH, E. Y. P. **Validação da técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras de sangue total e soro.** 2011. 58 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

SIQUEIRA, W. F. **rKDDR-plus:** Desenvolvimento de um novo antígeno recombinante com alto grau de motivos repetitivos para o uso no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina. 2018. 102 p. Dissertação (Mestre em Parasitologia)- Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2018.

SMRKOVSKI, L.L. ; LARSON, C. L. Antigenic cross-reactivity between *Mycobacterium bovis* (BCG) and *Leishmania donovani*. **Infection Immunology**, v.18, n.2, p.561-562, 1977.

SOARES, G. G. T. et al. Inquérito sorológico para leishmaniose visceral canina no município de Lavras-MG: dados preliminares. **Anais do XVIII Congresso brasileiro de parasitologia veterinária**, Gramado, 2014. (CD ROM).

SOLANO-GALLEGO L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal Clinical of Microbiology**, v.39, n.2, p.560-3, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 86, p.1-16, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Serological diagnosis of canine leishmaniasis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen and Leishmania 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT. **Parasites & Vectors**. v.7, n.111, p.1-10, 2014.

SRIVASTAVA P. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 105, n.1, p.1-6, 2011.

TEIXEIRA, A. I. P. et al. Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.114, p. 1-9, 2019.

TOLEZANO, J. E. et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Aracatuba County, São Paulo State Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.149, p. 280-284, 2007.

TRAVI, B. L et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.12, n.1: e0006082, p. 1-13, January 11, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006082>. Acesso em: 07/07/18.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. 2018. Atualizado em: 14/03/18. Disponível em: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 07/07/18.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. 2019. Disponível em: https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/. Acesso em: 07/04/19.

APÊNDICE A – Termo de autorização**TERMO DE AUTORIZAÇÃO**

Projeto intitulado: Avaliação do teste rápido imunocromatográfico para detecção da Leishmaniose visceral canina TR DPP®: sensibilidade, acurácia, comparação da utilização de coleta capilar e punção venosa, comparação com novo antígeno rKDDR.

Eu, _____
 RG _____, CPF _____, residente na
 Rua/Avenida _____
 _____, n° _____, complemento _____
 bairro _____, município _____, UF
 _____, proprietário(a) do animal _____, da
 raça _____, autorizo a participação do mesmo no projeto
 acima intitulado e concordo com o fornecimento de dados da anamnese, além do
 procedimento de coleta de uma gota de sangue com lanceta na ponta da orelha,
 coleta de secreção conjuntival com “swab” estéril, coleta venosa de 4 ml de
 sangue para realização de exames imunológicos para detecção de anticorpos
 para Leishmaniose visceral canina, e coleta de punção de medula óssea, com
 procedimento de sedação e analgesia do animal para a confirmação do parasita.
 A pesquisa não gerará nenhum gasto financeiro para o proprietário.

O projeto é coordenado pela professora Joziana Muniz de Paiva Barçante e será realizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Lavras.

Declaro que todas as minhas dúvidas foram devidamente esclarecidas.

Lavras, ___/___/_____.

ASSINATURA

APÊNDICE B – Características e dados dos cães amostrados

Característica e dados dos cães amostrados em Lavras e cidades circunvizinhas de agosto/2018 a janeiro de 2019.

A	Data coleta	Sexo	Idade (anos)	Raça	Bairro/Cidade	Quadro clínico	Escore SC	V *	Em tratamento para LVC	Coleira **	Área verde ***	Local casa	Saída livre do cão ****
1	01/08/18	F	1	Srd	Retiro/Lavras	S	5	N	S, alopurinol, 1 mês	S	S	E	N
2	21/08/18	F	NI	Rotweiler	Centro/Lavras	S	11	N	N	N	S	E	S
3	21/08/18	F	4	Pug	Santa Efigênia/Lavras	S	5	N	N	N	N	E	N
4	21/08/18	M	5	Shitzu	Ityrapuan/Lavras	S	6	N	N	N	S	E	N
5	13/08/18	F	2	Srd	Água Limpa/Lavras	S	11	N	N	S	NI	I	N
6	13/08/18	F	3	Shitzu	Jardim Fabiana/Lavras	A	0	N	N	S	NI	I	N
7	31/07/18	M	2	Srd	Ouro Preto/Lavras	A	0	N	N	N	N	E	N
8	05/07/18	M	8	Srd	Centro/Lavras	S	6	N	N	N	N	I	N
9	02/08/18	M	5	Pug	Santa Efigênia/Lavras	S	5	N	NI	N	NI	E	N
10	28/08/18	M	6	Beagle	Artur Bernardes/Lavras	A	3	N	N	S	S	E	N

11	28/08/18	M	3	Fila	Vale do Sol Lavras	S	14	N	N	N	NI	E	S
12	03/09/18	M	2	Srd	Centro/Lavras	S	5	N	N	S	N	I	N
13	29/08/18	M	3	Boder collie	Caminho das Águas/Lavras	A	0	N	NI	S	S	E	N
14	05/09/18	F	1	Srd	Pitangui/Lavras	S	4	N	N	N	NI	E	N
15	14/09/18	M	2	Fox paulistinha	Eldorado/Lavras	S	14	S	N	NI	NI	NI	NI
16	18/09/18	F	9	Srd	Centenário/Lavras	S	12	N	N	N	NI	I	N
17	20/09/18	M	1	Srd	Centro/Lavras	A	2	N	N	S	N	E	N
18	20/09/18	F	5	Srd	Centro/Lavras	A	0	N	N	S	NI	NI	N
19	25/09/18	F	NI	Srd	Centenário/Lavras	A	3	N	N	N	NI	NI	NI
20	02/10/18	F	4	Srd	Jd Glória/Lavras	A	0	N	N	NI	S	I	N
21	04/10/18	F	1	Pug	Centro/Lavras	A	0	N	S, alopurinol, 2 meses	N	NI	I	N
22	04/10/18	F	2	Srd	Centro/Lavras	A	3	N	S, miltefosina, 5 dias	S	N	E	N
23	05/10/18	M	NI	Srd	Ribeirão vermelho	S	7	NI	NI	NI	NI	E	S
24	05/10/18	M	1	Srd	Ribeirão vermelho	S	7	N	NI	N	NI	NI	NI
25	18/10/18	M	10	Cocker	Ribeirão vermelho	S	4	N	N	N	NI	I	S
26	25/10/18	F	NI	Pincher	Lavras	S	9	NI	NI	NI	NI	NI	NI

27	25/10/18	F	NI	Burriler	Lavras	S	9	NI	NI	NI	NI	NI	NI
28	29/10/18	M	1	Srd	Centro/ Lavras	A	2	N	N	N	S	E	NI
29	31/10/18	F	10	Srd	Vila São Francisco /Lavras	S	7	N	NI	NI	S	E	N
30	01/11/18	F	7	Boxer	Centro/ Lavras	A	1	N	N	S	E	E	S
31	14/11/18	M	NI	Srd	Lavras	S	8	NI	NI	NI	NI	NI	NI
32	14/11/18	M	NI	Poodle	Lavras	S	5	NI	NI	NI	NI	NI	NI
33	14/11/18	M	NI	Srd	Lavras	S	13	NI	NI	NI	NI	NI	NI
34	21/11/18	F	NI	Srd	Lavras	S	8	NI	NI	NI	NI	NI	NI
35	21/11/18	F	NI	Srd	Lavras	A	0	NI	NI	NI	NI	NI	NI
36	22/11/18	M	1	Shitzu	Colinas da serra/ Lavras	A	0	N	N	S	S	E	N
37	22/11/18	M	2	Srd	Colinas da serra/ Lavras	A	0	N	N	S	S	E	N
38	28/11/18	M	1	Buldogue	Jardim floresta/ Lavras	A	3	N	N	S	NI	I	N
39	29/11/18	M	1	Shitzu	Esplanada /Lavras	A	0	N	N	S	N	I	N
40	04/12/18	F	1	Srd	Lavras	S	6	NI	NI	NI	NI	NI	NI
41	05/12/18	F	NI	Srd	Lavras	S	6	NI	NI	NI	NI	NI	NI
42	06/12/18	F	1	Samoieda	Campo Belo	S	9	S	S	S	N	E	N
43	11/12/18	M	2	Blue weler	Centro/ Lavras	A	3	N	N	S	N	E	N

44	17/12/18	M	9	Srd	Ijaci	S	6	N	S alopurinol, domperidona, 3 dias	N	NI	E	N
45	18/12/18	M	6	Srd	Cruzeiro do sul/Lavras	S	4	N	N	S	N	E	N
46	18/12/18	M	5	Srd	Nepomuce no	S	8	N	N	N	S	E	S
47	18/12/18	F	7	Srd	Nepomuce no	S	10	N	N	N	S	E	S
48	18/12/18	M	6	Srd	Nepomuce no	S	13	N	N	N	S	E	S
49	17/01/19	M	6	Boxer	Nova Lavras/ Lavras	S	7	N	N	NI	N	E	N
50	28/01/19	M	8	Labrador	Centenário/ Lavras	A	0	N	N	S	NI	E	NI
51	28/01/19	F	14	Labrador	Alfahavile/ Lavras	A	1	N	S, alopurinol	S	S	I	N
52	28/11/18	F	7	Poodle	Serra Azul/ Lavras	A	0	N	N	S	S	I	N

Nota: (A) amostra, (SC) sinal clínico, (V), vacinado, (F) fêmea, (M) macho, (Srd) sem raça definida, (S) sim, (N) não, (I) interna, (E) externa

* Vacinação para LVC com Leishtec® em dia, de acordo com o protocolo vacinal.

** Uso de coleira com repelente para flebotomíneo dentro do período de validade de uso.

*** Até 200 metros da residência.

**** Cão sai sem a supervisão do tutor.

APÊNDICE C. Resultados laboratoriais

Resultados laboratoriais de todas as técnicas realizadas na pesquisa, sendo que cada número de amostra representa um cão proveniente do município de Lavras e cidades circunvizinhas

A	DPP® Orelha	DPP® venoso	TR rKDDR- plus	TR ALERE®	EIE rKDDR- plus	Parasitológico MO	PCR MO	PCR SC
1	P	P	P	P	P	N	P	-
2	P	P	N	N	N	N	P	-
3	N	N	N	N	N	N	N	-
4	N	N	N	N	N	N	N	-
5	P	P	P	P	P	N	P	-
6	N	N	N	N	N	N	P	-
7	N	N	N	N	p	N	P	-
8	N	N	N	N	N	-	P	-
9	P	P	P	P	P	N	P	-
10	P	P	P	P	P	N	P	-
11	P	P	P	P	P	N	P	-
12	N	N	N	N	N	N	P	-
13	N	N	N	N	N	N	P	-
14	P	P	N	N	N	N	P	-
15	P	P	P	P	P	N	P	-
16	P	P	P	P	P	N	P	P
17	P	P	P	P	P	N	P	P
18	N	N	N	N	N	N	N	P
19	N	N	N	N	N	N	P	P
20	N	N	N	N	N	N	P	N
21	P	P	P	P	P	N	P	P
22	P	P	P	P	P	N	P	P
23	P	P	P	P	P	N	P	N
24	P	P	P	P	P	P	P	P
25	P	P	P	N	P	N	P	P
26	P	P	P	P	P	P	P	P
27	P	P	P	P	P	P	P	P
28	P	P	P	P	P	N	P	-
29	P	P	P	P	P	N	P	P
30	P	P	P	P	P	N	P	P
31	P	P	P	P	P	-	P	P

A	DPP® Orelha	DPP® venoso	TRrKDDR- plus	TR ALERE®	EIE rKDDR- plus	Parasitológico MO	PCR MO	PCR SC
32	P	P	P	P	P	-	P	P
33	P	P	P	P	P	-	-	P
34	P	P	P	P	P	P	P	P
35	P	P	P	P	P	P	P	P
36	N	N	N	N	N	N	P	P
37	N	N	N	N	N	N	P	N
38	N	P	P	P	P	N	P	P
39	N	N	N	N	N	N	P	P
40	P	P	P	P	P	N	P	P
41	P	P	P	N	P	P	P	P
42	P	P	P	P	P	N	P	P
43	P	P	P	N	P	N	N	P
44	P	P	P	P	P	N	P	P
45	P	P	P	P	P	N	P	P
46	P	P	P	P	P	N	P	P
47	P	P	P	P	P	N	P	P
48	P	P	P	P	P	N	P	P
49	P	P	P	P	P	N	P	-
50	P	P	P	P	P	N	P	P
51	P	P	P	N	P	N	P	P
52	N	N	N	N	N	N	-	P
Total	52	52	52	52	52	48	50	35
(P)	37	38	36	32	37	6	46	32
(N)	15	14	16	20	15	42	4	3

Nota: (A) amostra, (P) positivo, (N) negativo. (TR) teste rápido, (EIE) ensaio imunoenzimático, (PCR) reação em cadeia da polimerase, (MO) medula óssea, (SC) "swab" conjuntival.

ANEXO A – Itens essenciais adotados segundo a declaração STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology), 2007.

Tabela. Itens essenciais que devem ser descritos em estudos observacionais, segundo a declaração Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE). 2007.

Item	Nº	Recomendação
Título e Resumo	1	Indique o desenho do estudo no título ou no resumo, com termo comumente utilizado Disponibilize no resumo um sumário informativo e equilibrado do que foi feito e do que foi encontrado
Introdução		
Contexto/Justificativa	2	Detalhe o referencial teórico e as razões para executar a pesquisa.
Objetivos	3	Descreva os objetivos específicos, incluindo quaisquer hipóteses pré-existentes.
Métodos		
Desenho do estudo	4	Apresente, no início do artigo, os elementos-chave relativos ao desenho do estudo.
Contexto (<i>setting</i>)	5	Descreva o contexto, locais e datas relevantes, incluindo os períodos de recrutamento, exposição, acompanhamento (follow-up) e coleta de dados.
Participantes	6	Estudos de Coorte: Apresente os critérios de elegibilidade, fontes e métodos de seleção dos participantes. Descreva os métodos de acompanhamento. Estudos de Caso-Controlle: Apresente os critérios de elegibilidade, as fontes e o critério-diagnóstico para identificação dos casos e os métodos de seleção dos controles. Descreva a justificativa para a eleição dos casos e controles Estudo Seccional: Apresente os critérios de elegibilidade, as fontes e os métodos de seleção dos participantes. Estudos de Coorte: Para os estudos pareados, apresente os critérios de pareamento e o número de expostos e não expostos. Estudos de Caso-Controlle: Para os estudos pareados, apresente os critérios de pareamento e o número de controles para cada caso.
Variáveis	7	Defina claramente todos os desfechos, exposições, preditores, confundidores em potencial e modificadores de efeito. Quando necessário, apresente os critérios diagnósticos.
Fontes de dados/ Mensuração	8 ^a	Para cada variável de interesse, forneça a fonte dos dados e os detalhes dos métodos utilizados na avaliação (mensuração). Quando existir mais de um grupo, descreva a comparabilidade dos métodos de avaliação.
Viés	9	Especifique todas as medidas adotadas para evitar potenciais fontes de vies.
Tamanho do estudo	10	Explique como se determinou o tamanho amostral.
Variáveis quantitativas	11	Explique como foram tratadas as variáveis quantitativas na análise. Se aplicável, descreva as categorizações que foram adotadas e porque.
Métodos estatísticos	12	Descreva todos os métodos estatísticos, incluindo aqueles usados para controle de confundimento. Descreva todos os métodos utilizados para examinar subgrupos e interações. Explique como foram tratados os dados faltantes ("missing data") Estudos de Coorte: Se aplicável, explique como as perdas de acompanhamento foram tratadas. Estudos de Caso-Controlle: Se aplicável, explique como o pareamento dos casos e controles foi tratado. Estudos Seccionais: Se aplicável, descreva os métodos utilizados para considerar a estratégia de amostragem. Descreva qualquer análise de sensibilidade.
Resultados		
Participantes	13 ^a	Descreva o número de participantes em cada etapa do estudo (ex: número de participantes potencialmente elegíveis, examinados de acordo com critérios de elegibilidade, elegíveis de fato, incluídos no estudo, que terminaram o acompanhamento e efetivamente analisados) Descreva as razões para as perdas em cada etapa. Avalie a pertinência de apresentar um diagrama de fluxo
Dados descritivos	14 ^a	Descreva as características dos participantes (ex: demográficas, clínicas e sociais) e as informações sobre exposições e confundidores em potencial. Indique o número de participantes com dados faltantes para cada variável de interesse. Estudos de Coorte: Apresente o período de acompanhamento (ex: média e tempo total)

Continua

Tabela continuação

Item	Nº	Recomendação
Desfecho	15 ^a	Estudos de Coorte: Descreva o número de eventos-desfecho ou as medidas-resumo ao longo do tempo Estudos de Caso-Controlle: Descreva o número de indivíduos em cada categoria de exposição ou apresente medidas-resumo de exposição. Estudos Seccionais: Descreva o número de eventos-desfecho ou apresente as medidas-resumo.
Resultados principais	16	Descreva as estimativas não ajustadas e, se aplicável, as estimativas ajustadas por variáveis confundidoras, assim como sua precisão (ex: intervalos de confiança). Deixe claro quais foram os confundidores utilizados no ajuste e porque foram incluídos. Quando variáveis contínuas forem categorizadas, informe os pontos de corte utilizados. Se pertinente, considere transformar as estimativas de risco relativo em termos de risco absoluto, para um período de tempo relevante.
Outras análises	17	Descreva outras análises que tenham sido realizadas. Ex: análises de subgrupos, interação, sensibilidade.
Discussão		
Resultados principais	18	Resuma os principais achados relacionando-os aos objetivos do estudo.
Limitações	19	Apresente as limitações do estudo, levando em consideração fontes potenciais de viés ou imprecisão. Discuta a magnitude e direção de vieses em potencial.
Interpretação	20	Apresente uma interpretação cautelosa dos resultados, considerando os objetivos, as limitações, a multiplicidade das análises, os resultados de estudos semelhantes e outras evidências relevantes.
Generalização	21	Discuta a generalização (validade externa) dos resultados.
Outras Informações		
Financiamento	22	Especifique a fonte de financiamento do estudo e o papel dos financiadores. Se aplicável, apresente tais informações para o estudo original no qual o artigo é baseado.

^a Descreva essas informações separadamente para casos e controles em Estudos de Caso-Controlle e para grupos de expostos e não expostos, em Estudos de Coorte ou Estudos Seccionais.

Nota: Documentos mais detalhados discutem de forma mais aprofundada cada item do *checklist*, além de apresentarem o referencial teórico no qual essa lista se baseia e exemplos de descrições adequadas de cada item (Vandenbroucke et al.^{24,25} A *checklist* do STROBE é mais adequadamente utilizada em conjunto com esses artigos (disponíveis gratuitamente no site das revistas PLoS Medicine [www.plosmedicine.org], Annals of Internal Medicine [www.annals.org] e Epidemiology [www.epidem.com]). No website da iniciativa STROBE (www.strobe-statement.org) estão disponíveis versões separadas de *checklist* para Estudos de Coorte, Caso-Controlle ou Seccionais. Reproduzida de von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. Declaração STROBE: Diretrizes para a comunicação de estudos observacionais [material suplementar na internet]. Malta M, Cardoso LO, tradutores. In: Malta M, Cardoso LO, Bastos FI, Magnanini MMF, Silva CMFP. Iniciativa STROBE: subsídios para a comunicação de estudos observacionais. *Rev Saude Publica*. 2010;44(3):559-65.

ANEXO B – Itens essenciais adotados pela iniciativa STARD (Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy), 2015.

Section & Topic	No	Item
TITLE OR ABSTRACT		
	1	Identification as a study of diagnostic accuracy using at least one measure of accuracy (such as sensitivity, specificity, predictive values, or AUC)
ABSTRACT		
	2	Structured summary of study design, methods, results, and conclusions (for specific guidance, see STARD for Abstracts)
INTRODUCTION		
	3	Scientific and clinical background, including the intended use and clinical role of the index test
	4	Study objectives and hypotheses
METHODS		
<i>Study design</i>	5	Whether data collection was planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)
<i>Participants</i>	6	Eligibility criteria
	7	On what basis potentially eligible participants were identified (such as symptoms, results from previous tests, inclusion in registry)
	8	Where and when potentially eligible participants were identified (setting, location and dates)
	9	Whether participants formed a consecutive, random or convenience series
<i>Test methods</i>	10a	Index test, in sufficient detail to allow replication
	10b	Reference standard, in sufficient detail to allow replication
	11	Rationale for choosing the reference standard (if alternatives exist)
	12a	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the index test, distinguishing pre-specified from exploratory
	12b	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the reference standard, distinguishing pre-specified from exploratory
	13a	Whether clinical information and reference standard results were available to the performers/readers of the index test
	13b	Whether clinical information and index test results were available to the assessors of the reference standard
<i>Analysis</i>	14	Methods for estimating or comparing measures of diagnostic accuracy
	15	How indeterminate index test or reference standard results were handled
	16	How missing data on the index test and reference standard were handled
	17	Any analyses of variability in diagnostic accuracy, distinguishing pre-specified from exploratory
	18	Intended sample size and how it was determined
RESULTS		
<i>Participants</i>	19	Flow of participants, using a diagram
	20	Baseline demographic and clinical characteristics of participants
	21a	Distribution of severity of disease in those with the target condition
	21b	Distribution of alternative diagnoses in those without the target condition
	22	Time interval and any clinical interventions between index test and reference standard
<i>Test results</i>	23	Cross tabulation of the index test results (or their distribution) by the results of the reference standard
	24	Estimates of diagnostic accuracy and their precision (such as 95% confidence intervals)
	25	Any adverse events from performing the index test or the reference standard
DISCUSSION		
	26	Study limitations, including sources of potential bias, statistical uncertainty, and generalisability
	27	Implications for practice, including the intended use and clinical role of the index test
OTHER INFORMATION		
	28	Registration number and name of registry
	29	Where the full study protocol can be accessed
	30	Sources of funding and other support; role of funders