

UNIVERSIDADE FERERAL DO PARANÁ

NELÍ MAZIERO

OCORRÊNCIA DE *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908) EM CÃES DO EXTREMO-  
OESTE DO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL

CURITIBA

2014

NELÍ MAZIERO

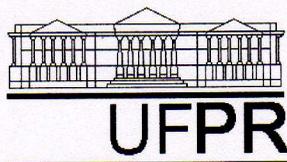
OCORRÊNCIA DE *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908) EM CÃES DO EXTREMO-  
OESTE DO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Processos Biotecnológicos, do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Área de Concentração Saúde Humana e Animal, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA

2014



## RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

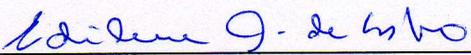
Aos nove dias do mês de dezembro de 2014, na Sala de Aula do Prédio do CENBAPAR do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Nonagésima Primeira Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

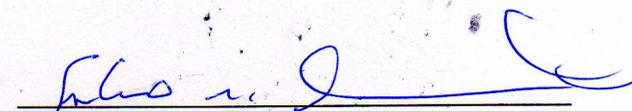
A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia ficou constituída pelos membros: Profª Drª Edilene Alcântara de Castro (UFPR), Dr Sandro Nelson Lunedo (Laboratório São Vicente / LATAM) e Profª Drª Vanete Thomaz Soccol (UFPR – orientadora da dissertação).

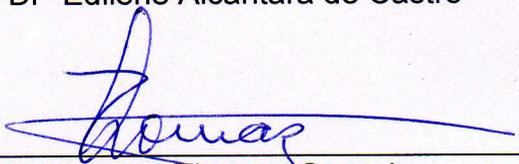
Às 14h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Nelí Maziero**, a fazer a apresentação da dissertação intitulada: “OCORRÊNCIA DE *Leishmania infantum* EM CÃES DO EXTREMO-OESTE DO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Profª Drª Edilene Alcântara de Castro, Dr Sandro Nelson Lunedo, e Profª Drª Vanete Thomaz Soccol declarou a candidata APROVADA (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 09 de Dezembro de 2014.

  
Profª Drª Edilene Alcântara de Castro

  
Dr Sandro Nelson Lunedo

  
Profª Drª Vanete Thomaz Soccol

## DEDICATÓRIA

A meus pais Neurí e Marilene e meus irmãos, Celí e Maurí, pelo amor, compreensão e incentivo nos momentos de alegrias e dificuldades em toda minha vida, contribuindo para tornar possível a realização deste sonho. Ao meu namorado Marcelo, por todo o apoio, dedicação e carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço inicialmente a Deus, pela família maravilhosa que escolheu para mim, por estar sempre iluminando meu caminho, abrindo portas e colocando pessoas especiais em minha vida.

À Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, por aceitar a incumbência de fornecer conhecimentos específicos em resposta às demandas dos serviços públicos de saúde, transformando o saber em uma ferramenta para o benefício direto da sociedade.

À Professora Dra. Vanete Thomaz Soccol, grande mestre, pela orientação, confiança, ensinamentos, pelas preciosas oportunidades oferecidas e pela amizade construída. Obrigada por me fazer crescer não apenas como pesquisadora, mas também como pessoa. Dedicção, ética e competência fazem de você uma pessoa única e especial.

Aos colegas de laboratório e de curso que foram muito especiais nesta fase da minha vida, obrigado pelo agradável convívio, por todos os ensinamentos, pelos auxílios e pela amizade.

Aos médicos veterinários Diego Rossini e Evandro Rech pela ajuda nas coletas a campo.

Aos proprietários dos cães e à ONG Amigo Bicho que gentilmente nos permitiram realizar a colheita de sangue de seus animais, sempre nos acolhendo em suas propriedades de forma calorosa.

A todos que, de uma forma ou outra, colaboraram para que este trabalho fosse realizado com êxito.

## RESUMO GERAL

A rápida expansão da Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil, especialmente na região Sul, levanta a hipótese de que no extremo-oeste de Santa Catarina, haveria transmissão autóctone do parasito responsável pela doença. Para atingir o objetivo geral foi realizada a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania infantum* e de DNA de *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães que agiriam como sinalizadores da possível presença do ciclo do parasito na região. Duas técnicas sorológicas (Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI e Ensaio Imunoenzimático - ELISA) e pesquisa de DNA do parasito por técnica molecular (Reação em Cadeia da Polimerase - PCR) foram empregadas. Dentre os 252 cães estudados, 43 (17,1%) foram sororreagentes por RIFI, 50 (19,8%) por ELISA e 55 (21,8%) apresentaram amplificação de fragmento de DNA específico para *L.(L.) infantum*, por PCR, usando primers RV1 e RV2. Do total 48 animais (19,0%) foram positivos por dois métodos (sorológico e molecular) e 42 (16,7%) apresentaram sinais clínicos compatíveis com LV. A análise dos dados revelou que o diagnóstico positivo foi estatisticamente associado com raça e idade ( $p \leq 0,05$ ) dos animais. O índice Kappa apresentou correlação muito boa entre os testes ELISA e RIFI (0,618), ELISA e PCR (0,627) e excelente entre RIFI e PCR (0,849). A dispersão do processo endêmico-zoonótico vem se fazendo de modo progressivo de cidade a cidade, acompanhando as rodovias, em consequência do aumento da mobilidade das populações, atingindo regiões indenes, constituindo novos circuitos de produção da doença. Este estudo piloto confirma a ocorrência de LV canina na região do extremo-oeste de Santa Catarina, caracterizando novo foco da doença.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Cães. Diagnóstico.

## ABSTRACT

The rapid expansion of Visceral Leishmaniosis (VL) in Brazil, especially in the South, raises the hypothesis that in the far western of Santa Catarina, would autochthonous transmission of the parasite. To achieve the overall goal for antibodies anti-*Leishmania infantum* and DNA of *Leishmania (Leishmania) infantum* in dogs that would act as indicators of the possible presence of the parasite cycle in the region was held. Two serological techniques (Indirect Immunofluorescent Antibody Test – IFAT and Enzyme-linked Immunosorbent Assay - ELISA) and search for parasite DNA by molecular techniques (Polymerase Chain Reaction - PCR) were used. Of the 252 dogs studied, 43 (17.1%) were seropositive by IFAT; 50 (19.8%) by ELISA and 55 (21.8%) showed amplification of DNA specific fragment for *L (L.) Infantum*, by PCR, using RV1 and RV2 primers. Of the total 48 animals (19.0%) were positive for both methods (serological and molecular) and 42 (16.7%) showed clinical signs compatible with VL. Data analysis revealed that the positive diagnosis was statistically associated with breed and age animals ( $p \geq 0.05$ ). The Kappa index showed very good correlation between the ELISA and IFAT (0.618), PCR and ELISA (0.627) and excellent correlation between IFAT and PCR (0.849). The process dispersion-endemic zoonotic has been doing progressively from town to town, following the road as a result of increased mobility of populations, reaching unaffected areas, forming new circuits producing the disease. This pilot study confirms the occurrence of canine VL in the western region of Santa Catarina, featuring new outbreak.

Keywords: Visceral Leishmaniosis. Dogs. Diagnosis.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

FIGURA 1 -	SITUAÇÃO DA ENDEMICIDADE DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNDO EM 2012.....	22
FIGURA 2-	EXPANSÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL (1983 – 2010).....	24
FIGURA 3 -	INCIDÊNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL (100.000 HABITANTES) NO BRASIL E REGIÕES (1980 A 2011).....	25
FIGURA 4 -	MAPA DAS ÁREAS COM TRANSMISSÃO DE LV NO BRASIL NO PERÍODO DE 2009 A 2011.....	25
FIGURA 5 -	LETALIDADE DA LV NO BRASIL NO PERÍODO DE 2000 A 2009.....	28
FIGURA 6 -	ALTERAÇÕES CLÍNICAS OBSERVADAS NOS ANIMAIS COM LEISHMANIOSE VISCERAL DA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA, BRASIL. (A). CÃO APRESENTANDO EMAGRECIMENTO, DESIDRATAÇÃO, APATIA, ALOPECIA E LESÕES PELO CORPO (B).CÃO DESIDRATADO E APÁTICO (C). CÃO APRESENTANDO ONICOGRIFOSE. (D). CÃO COM EMAGRECIMENTO ACENTUADO .....	34

### CAPÍTULO II

FIGURA 1 -	LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA ÁREA DE ESTUDO PARA OCORRÊNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL NA REGIÃO EXTREMO-OESTE DO ESTADO DE SANTA CATARINA, SUL DO BRASIL (EM VERMELHO) .....	77
FIGURA 2 -	PRESENÇA DE OUTROS ANIMAIS NAS PROPRIEDADES DA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA, BRASIL, 2012 - 2014.....	87
FIGURA 3 -	PRESENÇA DE MATERIAL ORGÂNICO NO QUINTAL NAS PROPRIEDADES DA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA, BRASIL, 2012 - 2014.....	87
FIGURA 4 -	DESTINO DO ESGOTO DAS PROPRIEDADES DA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA, BRASIL, 2012 - 2014.....	88
FIGURA 5 -	DESTINO DO LIXO DAS RESIDÊNCIAS DA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA, BRASIL, 2012 - 2014.....	88
FIGURA 6 -	ALTERAÇÕES CLÍNICAS OBSERVADAS NOS ANIMAIS COM LEISHMANIOSE VISCERAL DA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE	

	SANTA CATARINA, BRASIL. (A). CÃO APRESENTANDO LINFONODO AUMENTADO. (B). CÃO APRESENTANDO ANOREXIA, DESIDRATAÇÃO, APATIA, ALOPECIA E LESÕES PELO CORPO. (C). CÃO COM LESÕES DE FACE E ORELHA. (D). CÃO APRESENTANDO EMAGRECIMENTO ACENTUADO .....	89
FIGURA 7 -	LOCAL DA LESÃO DE PELE ENCONTRADA NOS CÃES DA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA, BRASIL, 2012 - 2014.....	90
FIGURA 8 -	PERCENTUAL DE CÃES POSITIVOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL DE ACORDO COM OS TESTES SOROLÓGICOS (RIFI E ELISA) E MOLECULAR (PCR) NA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA, BRASIL. ....	91
FIGURA 9 -	PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>LEISHMANIA</i> DE 252 CÃES DA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA, CONTRA O SORO DE ANIMAIS CONSIDERADOS SADIOS (NEGATIVO) E INFECTADOS (POSITIVO) – CURVA ROC. A LINHA HORIZONTAL REPRESENTA O “ <i>CUT-OFF</i> ” (FORNECIDO PELA CURVA ROC). AS FORMAS GEOMÉTRICAS REPRESENTAM O RESULTADO DE UM INDIVÍDUO. ....	91
FIGURA 10 -	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO O PERFIL DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA PELA TÉCNICA DE PCR USANDO OS INICIADORES RV1 E RV2 DE AMOSTRAS REFERÊNCIA DE <i>L. INFANTUM</i> E AMOSTRAS DE SANGUE DE ANIMAIS DA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA. 1 - MARCADOR MOLECULAR DE 100PB (INVITROGEN®); 2 - AMOSTRA REFERÊNCIA <i>L. INFANTUM</i> ; 3 – SMO81; 4 – SMO86; 5 – SMO168; 6 – CONTROLE NEGATIVO USANDO SANGUE DE CÃO LIVRE DA INFECÇÃO; 7 - CONTROLE NEGATIVO SEM DNA .....	93
FIGURA 11 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS RESULTADOS DA DISTRIBUIÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL NA POPULAÇÃO CANINA DA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA. O PICO DA PIRÂMIDE SE REFERE AOS CÃES AMOSTRADOS COM SINAIS CLÍNICOS DA DOENÇA. CÃES SOROPOSITIVOS REPRESENTAM A SEGUNDA FRAÇÃO. MAIS FREQUENTE QUE CÃES COM A DOENÇA CLÍNICA E SOROPOSITIVOS FORAM OS CÃES DIAGNOSTICADOS PELA PCR.....	99
FIGURA 12 -	REPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS DA DISTRIBUIÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL NA POPULAÇÃO CANINA EM REGIÃO COM FOCO ENDÊMICO. O TOPO DA PIRÂMIDE	

CONSISTE NOS CÃES COM SINAIS CLÍNICOS DA DOENÇA. CÃES SOROPOSITIVOS SEM SINAIS DA DOENÇA REPRESENTAM A SEGUNDA FRAÇÃO. A TERCEIRA FRAÇÃO INCLUI ANIMAIS ASSINTOMÁTICOS PCR POSITIVOS, MAS SORONEGATIVOS INFECTADOS, E A QUARTA FRAÇÃO INCLUI CÃES QUE SÃO SORONEGATIVOS E NÃO RETÉM O PARASITO.....99

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

TABELA 1 -	TAXA DE INCIDÊNCIA DE NOVOS CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL (CASOS POR 100.000 HABITANTES) POR REGIÃO DO BRASIL NO PERÍODO DE 2004 A 2012.....	26
TABELA 2 -	CASOS CONFIRMADOS DE LV HUMANA SEGUNDO REGIÃO DO BRASIL NO ANO DE 2013.....	26
TABELA 3 -	TAXA DE OCORRÊNCIA DE NOVOS CASOS (CASOS POR 100.000 HABITANTES) DA LV POR UNIDADE FEDERADA SEGUNDO LOCAL DE RESIDÊNCIA NO PERÍODO DE 2004 A 2012.....	27
TABELA 4 -	TAXA DE OCORRÊNCIA DE CASOS CONFIRMADOS NOTIFICADOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA SEGUNDO UNIDADE FEDERADA NA REGIÃO SUL DO BRASIL NO PERÍODO DE 2010 A 2013.....	29
TABELA 5 -	VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA A DETECÇÃO DE <i>L. infantum</i> EM CÃES.....	49
TABELA 6 -	ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE LV CANINA COM DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, AUTORES, PREVALÊNCIA, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO NO BRASIL E NO MUNDO .....	51

### CAPÍTULO II

TABELA 1 -	AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE <i>L. infantum</i> PARA OS INICIADORES RV1F E RV2R.....	82
TABELA 2 -	INTERPRETAÇÃO DOS VALORES DO ÍNDICE KAPPA .....	82
TABELA 3 -	ÍNDICES PARA AFERIÇÃO DOS RESULTADOS DO TESTE DE ELISA/PCR COMPARANDO COM O TESTE DE REFERÊNCIA DE RIFI .....	83
TABELA 4 -	ALGORITMO PARA CONSIDERAR UM ANIMAL POSITIVO .....	84
TABELA 5 -	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES E DA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA, BRASIL, 2012-2014 .....	85
TABELA 6 -	SINAIS CLÍNICOS MAIS FREQUENTES OBSERVADOS NOS CÃES COM SOROLOGIA E/OU PCR POSITIVA (S) NA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA, BRASIL .....	89

TABELA 7 -	NÚMERO E PERCENTUAL DE ANIMAIS POSITIVOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL SEGUNDO OS MÉTODOS SOROLÓGICO (RIFI E ELISA) E MOLECULAR (PCR) E RELAÇÃO COM A FORMA CLÍNICA DA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA, BRASIL, 2012 - 2014.....	90
TABELA 8 -	ANÁLISE DA REPRODUTIBILIDADE INTRA-ENSAIO PARA O TESTE ELISA (ANTI- <i>Leishmania</i> ) .....	92
TABELA 9 -	ANÁLISE DA REPRODUTIBILIDADE INTER-ENSAIO PARA O TESTE ELISA (ANTI- <i>Leishmania</i> ) .....	92
TABELA 10 -	ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA ENTRE AS TÉCNICAS MOLECULAR E SOROLÓGICA, CUJO DESEMPENHO FOI ESTABELECIDO COM BASE NA COMPARAÇÃO À TÉCNICA DE REFERÊNCIA - RIFI.....	93
TABELA 11 -	ANÁLISE DOS DADOS DE DESEMPENHO DO TESTE DE ELISA COM BASE NOS CÁLCULOS GERADOS PELA CURVA ROC .....	94
TABELA 12 -	ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA KAPPA ENTRE AS TÉCNICAS RIFI, ELISA E PCR .....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS

CCS	Coração-Cérebro-Sangue
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotídeos Trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
Kda	Kilodalton
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
LV	Leishmaniose visceral
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
NNN	Meio de cultura Novy-McNeal-Nicolle
OPD	Ortophenilenediamina
pb	Pares de bases
PBS	Solução de fosfato tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real quantitativa
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TE	Tris-EDTA
WHO	World Health Organization (OMS)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
---------------------------	-----------

<b>CAPÍTULO I – ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: UMA REVISÃO</b> .....	<b>18</b>
---	-----------

<b>RESUMO</b> .....	<b>18</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>19</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
<b>3 EPIDEMIOLOGIA</b> .....	<b>22</b>
<b>4 ASPECTOS CLÍNICOS DA LV CANINA</b> .....	<b>32</b>
<b>5 DIAGNÓSTICO</b> .....	<b>35</b>
5.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	37
5.2 MÉTODOS PARASITOLÓGICOS E CULTURAS .....	37
5.3 MÉTODOS SOROLÓGICOS .....	39
<b>5.3.1 Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI</b> .....	<b>41</b>
<b>5.3.2 Ensaio Imunoenzimático - ELISA</b> .....	<b>42</b>
<b>5.3.3 Testes Imunocromatográficos</b> .....	<b>44</b>
5.4 TÉCNICAS MOLECULARES .....	46
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>54</b>

<b>CAPÍTULO II - FOCO RURAL-URBANO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO EXTREMO-OESTE DO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL</b> .....	<b>69</b>
---	-----------

<b>RESUMO</b> .....	<b>69</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>70</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>71</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>73</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	73
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	73
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>74</b>
<b>4 HIPÓTESES</b> .....	<b>76</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>77</b>
5.1 ÁREA DE ESTUDO.....	77
5.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	78
5.3 POPULAÇÃO CANINA ESTUDADA .....	78
5.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA .....	79
5.5 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL PARA ELISA .....	79
5.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) .....	79
<b>5.6.1 Avaliação do ponto de corte (“cut off”)</b> .....	<b>80</b>
5.7 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO PARA RIFI.....	80

5.8 REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) .....	81
5.9 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) .....	81
5.10 ÍNDICE KAPPA .....	82
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	83
5.12 ALGORITMO PARA CONSIDERAR UM ANIMAL POSITIVO .....	84
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>95</b>
<b>8 CONCLUSÕES .....</b>	<b>107</b>
<b>9 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>108</b>
<b>10 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>117</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>130</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica grave, de caráter zoonótico, constituindo importante problema de saúde pública, uma vez que é frequentemente fatal se não tratada em tempo e adequadamente (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011).

A doença é considerada uma das seis doenças mais importantes no mundo causadas por protozoários, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2001; 2010). A LV possui ampla distribuição mundial e registro de casos em todos os continentes, à exceção da Oceania (BRASIL, 2010b). São aproximadamente 500 mil casos por ano, resultando em uma incidência anual de 50 mil mortes decorrentes da LV em todo o mundo. Entre as doenças tropicais, a mortalidade da LV só é superada em números pela malária. Atualmente é considerada endêmica em 98 países e mais de 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Sudão e Etiópia (DEN BOER *et al.*, 2011; ALVAR *et al.*, 2012).

No Brasil, a LV é endêmica em vários municípios, apresentando mudanças importantes no padrão de transmissão. Inicialmente o ciclo do parasito predominava em ambientes silvestres e áreas rurais. Mais recentemente passou a ser endêmica em centros urbanos. As maiores taxas de infecção eram registradas no Nordeste. Porém, a doença expandiu-se para as regiões periurbanas ou urbanas de outras regiões e atualmente cerca de 50% dos casos ocorrem fora da região Nordeste e já atinge as cinco regiões brasileiras (BRASIL, 2010b).

A região Sul do Brasil era considerada indene para esta parasitose, mas com casos alóctones, vindos de outras regiões endêmicas como Mato Grosso e estado de São Paulo. No estado do Paraná, pesquisa sobre vetores realizada em 46 localidades distribuídas em 37 municípios do Paraná, no período de março de 2004 a novembro de 2005, não observou o vetor específico (*Lutzomia longipalpis*) (SILVA *et al.*, 2008). De acordo com Thomaz-Soccol *et al.* (2009), casos alóctones de LV canina, indicando animais com sinais clínicos compatíveis, foram encontrados nos anos 2000 a 2008 no Paraná, com isolamento e identificação do parasito, comprovando tratar-se de *L. infantum*. Pelo fato da LV ser uma zoonose e ter o cão doméstico como o principal reservatório, os casos diagnosticados em áreas não endêmicas devem ter avaliação epidemiológica e vetorial, pois a migração de animais portadores do parasito pode disseminar a doença para outras regiões,

desde que encontrem ecótopo adequado e vetor específico (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009). No ano de 2013, casos autóctones de LV canina foram registrados na cidade de Foz do Iguaçu, na fronteira com Argentina e Paraguai (DIAS *et al.*, 2013), comprovando tratar-se de *L. infantum* e com confirmação da presença do vetor *Lu. longipalpis* (SANTOS; FERREIRA; BISELTO-JUNIOR, 2012; DIAS *et al.*, 2013).

Em 2008, no Rio Grande do Sul foram registrados os primeiros casos de LV canina na cidade de São Borja, fronteira com a Argentina. Na mesma cidade ocorreram os primeiros casos em humanos em 2009 (BRASIL, 2010a). Segundo o Ministério da Saúde, até 2010, haviam sido identificados sete municípios do Rio Grande do Sul com a presença do vetor (*Lu. longipalpis*), todos localizados na fronteira com a Argentina (Barra do Quaraí, Uruguaiana, Itaqui, São Borja, Garruchos, Pirapó e Porto Xavier). Também foram registrados 11 municípios com a presença de cães sorologicamente positivos para *L. infantum*, sem isolamento do parasito, sendo que cinco dessas cidades fazem fronteira com o território argentino (Barra do Quaraí, Uruguaiana, Itaqui, São Borja e Porto Xavier) (BRASIL, 2010a).

Santa Catarina era um estado considerado indene para LV até recentemente, com registros em Florianópolis de casos autóctones de LV canina (FIGUEIREDO *et al.*, 2012; STEINDEL *et al.*, 2013), no entanto a presença do vetor *Lu. longipalpis* ainda não foi confirmada no estado.

Os municípios do extremo-oeste de Santa Catarina fazem fronteira com a Argentina e também estão muito próximos ao Rio Grande do Sul, portanto, é de suma importância a investigação, bem como a vigilância para os casos de LV canina, uma vez que a presença dessa doença em cães, geralmente, antecede o seu aparecimento em humanos.

A região do extremo-oeste de Santa Catarina localiza-se em um ambiente rural, com grandes extensões de matas e presença de animais silvestres, principalmente próximos a fronteira com o país argentino. É importante salientar que é comum na região a prática de caça com cães, o que pode ser o fator desencadeante para um surto da doença, uma vez que na Argentina tem sido registrados focos de LV próximos à divisa (SALOMON *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2010).

Considerando-se o aumento do número de casos de LV na região Sul do Brasil, a relevância da doença, a possibilidade de identificação e vigilância dos possíveis cães afetados e a falta de dados epidemiológicos referentes à LV canina

na região do extremo-oeste de Santa Catarina, foi realizado o presente trabalho. O objetivo principal foi de investigar a ocorrência de *L. infantum* em cães da região, que atuariam como sinalizadores da possível presença do ciclo do parasito, representando risco para humanos. Este trabalho será apresentado em dois capítulos. No primeiro será feito uma revisão da literatura e o segundo apresentará dados de levantamento sorológico e molecular obtidos no extremo-oeste de Santa Catarina.

## **CAPÍTULO I – ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: UMA REVISÃO**

### **RESUMO**

Dada a relevância da leishmaniose visceral canina, objetiva-se neste capítulo contruir uma revisão de literatura abordando aspectos epidemiológicos da doença, formas clínicas em cães e o diagnóstico de LV canina, além de discutir vantagens e desvantagens dos métodos analíticos. A pesquisa bibliográfica foi construída com base na análise de artigos oriundos das bases eletrônicas SciELO (Scientific Library Eletronic) e PUBMED, além de livros texto da área.

Palavras-chave: Epidemiologia. Leishmaniose visceral canina. Diagnóstico.

## **EPIDEMIOLOGICAL, CLINICAL ASPECTS AND DIAGNOSIS OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS: A REVIEW**

### **ABSTRACT**

Given the importance of canine visceral leishmaniasis, the objective is to build in this chapter a literature review epidemiological aspects of the disease, clinical forms in dogs and the diagnosis of canine VL, and discusses advantages and disadvantages of analytical methods. The literature was built based on the analysis of articles from the electronic databases SciELO (Scientific Electronic Library) and PubMed, and textbooks in the area.

Keywords: Epidemiology. Canine visceral leishmaniasis. Diagnosis.

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que apresentam uma alta taxa de incidência no mundo, inclusive no Brasil. Os cães são considerados reservatórios domésticos importantes no ciclo infeccioso da leishmaniose visceral.

No cão, as manifestações clínicas estão associadas, inicialmente, ao tipo de resposta imunológica desenvolvida. A partir da suspeita clínica, a confirmação do diagnóstico da LV é feita por exames parasitológicos, imunológicos e moleculares. O diagnóstico clínico da LV canina é difícil de ser realizado devido à variedade de sintomas. Além disso, os animais podem permanecer assintomáticos por toda a vida ou desenvolver sintomas após períodos que variam de três meses a alguns anos.

Diante do exposto, o objetivo deste capítulo compreende realizar uma revisão de literatura acerca da LV canina abordando os métodos de diagnóstico da patologia e também os aspectos clínicos e epidemiológicos, que são indispensáveis na construção da hipótese diagnóstica e na condução de medidas de controle.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

A pesquisa bibliográfica foi fundamentada e desenvolvida a partir da análise de artigos científicos obtidos nas bases de dados Scientific Eletronic Library Online (SciELO), PUBMED e livros-texto da área.

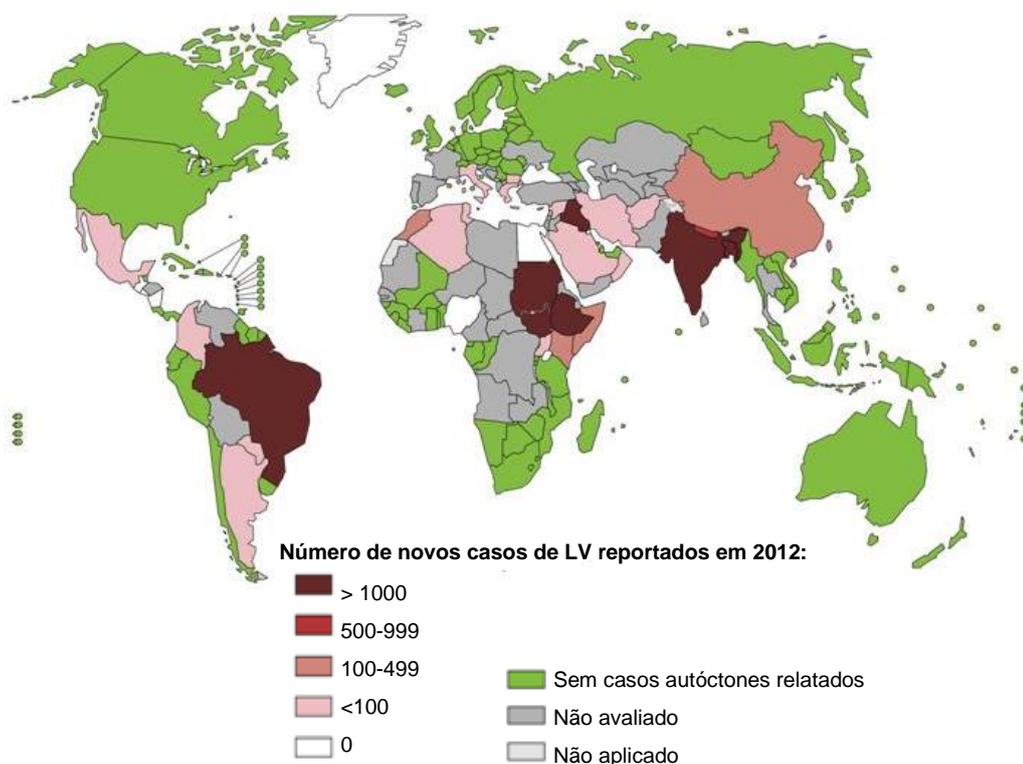
Buscou-se construir uma revisão de literatura acerca das principais características clínicas e epidemiológicas da LV canina, tendo como princípio e direcionamento a apresentação da patologia com ênfase em seu diagnóstico.

### 3 EPIDEMIOLOGIA

A distribuição geográfica da LV possui íntima relação com movimentos populacionais, disponibilidade de reservatórios, modificações ambientais, baixa condição econômica da população e distribuição geográfica do vetor (DANTAS-TORRES, 2006; ABRANTES, SILVEIRA, 2009; COSTA, 2011). A doença vem se apresentando como um crescente e grave problema de saúde pública no Brasil, pela franca expansão geográfica em decorrência de alterações no ambiente natural (BARATA, *et al.*, 2005; BRASIL, 2005; OLIVEIRA, 2005).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), anualmente, cerca de 12 milhões de pessoas se infectam com *Leishmania* sp. e 350 milhões estão expostas aos riscos de infecção. A cada ano, ocorrem 1,5 a 2,0 milhões de novos casos com 59 mil óbitos. A leishmaniose está entre as endemias consideradas prioritárias no mundo (WHO, 2010).

Os números de casos de LV até o ano de 2012 em todo o mundo são apresentados na Figura 1. A situação é de alerta devido a alta prevalência de LV em determinadas regiões e registro de novos casos em regiões onde ela não era encontrada.



**Figura 1** – Situação da endemicidade de leishmaniose visceral no mundo em 2012.

Fonte: WHO, Leishmaniosis: Status of endemicity of visceral leishmaniosis, worldwide, 2012. Disponível em: [http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniosis\\_VL\\_2013.png?ua=1](http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniosis_VL_2013.png?ua=1). Acesso em: 01 fev. 2014.

A Índia é o país mais afetado pela LV, juntamente com Bangladesh e Nepal, sendo responsável por cerca de 60% de todos os casos notificados no mundo. Além disso, 190 milhões de pessoas encontram-se em risco de infecção nessa área (SUNDAR *et al.*, 2008).

Na Europa a LV canina concentra-se principalmente nos países do Mar Mediterrâneo (Itália, França, Portugal e Espanha). Estudos realizados nestas regiões demonstram uma prevalência de aproximadamente 20% em cães domésticos (FISA *et al.*, 1999; CARDOSO *et al.*, 2004; SOBRINO *et al.*, 2008; MARTY *et al.*, 2009). De forma global, a soroprevalência canina na região mediterrânea, assim como no oriente médio, oscila entre valores de 10 a 37% (MOHAMMADIHA *et al.*, 2013). Em Portugal, um país onde a doença se disseminou principalmente nos últimos 20 anos, em alguns locais atingiu índice de prevalência acima de 20% (CORTES *et al.*, 2012).

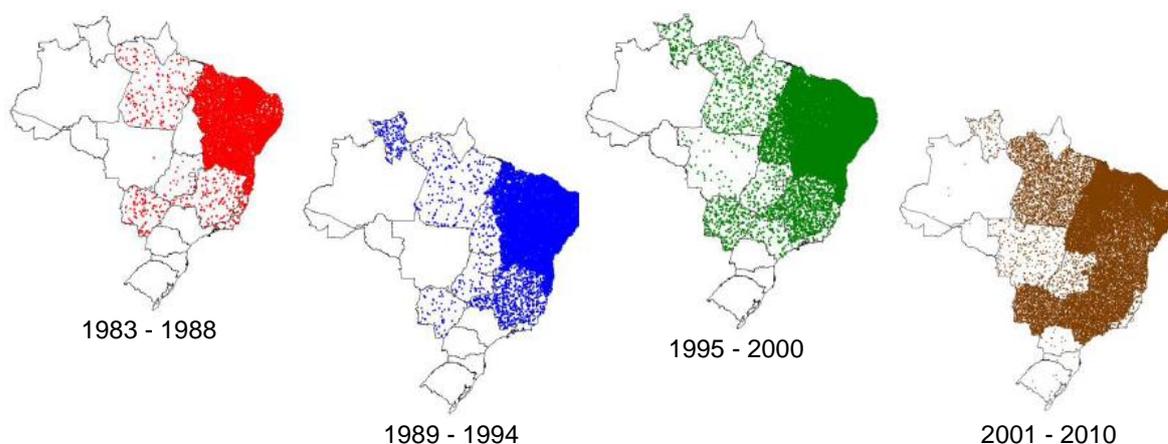
Nas Américas, a LV é descrita desde o México até o norte da Argentina, atingindo países como Guatemala, Honduras, Nicarágua, Colômbia, Venezuela, Brasil, Argentina e Paraguai (SILVA *et al.*, 2008; SALOMON *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2010, DANTAS-TORRES *et al.*, 2012; ALVAR *et al.*, 2012). A doença já foi descrita em 12 países da América Latina, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil (COURA, 2005, BRASIL, 2006). A adaptação dos vetores da *Leishmania* em áreas onde não existiam, tem contribuído para modificar a distribuição da doença na América Latina. Desta forma, destacam-se os países do Mercosul, antes considerados indenes para LV e cuja principal forma clínica era a leishmaniose tegumentar americana (LTA). Neste cenário, destaque é dado para a situação epidemiológica da LV na Argentina, país em que os casos da doença começaram a surgir em 2005 e vem crescendo nos últimos anos, com aumento gradativo de óbitos, comprovando a grande expansão e urbanização da doença (SALOMON *et al.*, 2008; SALOMON *et al.*, 2009).

No Brasil, até meados da década de 80, a LV tinha caráter eminentemente rural e ocorria principalmente em municípios com baixo índice de desenvolvimento humano (IDH). Nas últimas décadas houve significativa modificação deste perfil epidemiológico com a expansão e urbanização da doença, demonstrando várias alterações na sua cadeia epidemiológica (BRASIL, 2006, 2010b). A LV está se disseminando para grandes centros urbanos em decorrência das modificações sócio-ambientais e da migração populacional em busca de melhores condições sócio-econômicas (DANTAS-TORRES, 2006; CERBINO-NETO; WERNECK;

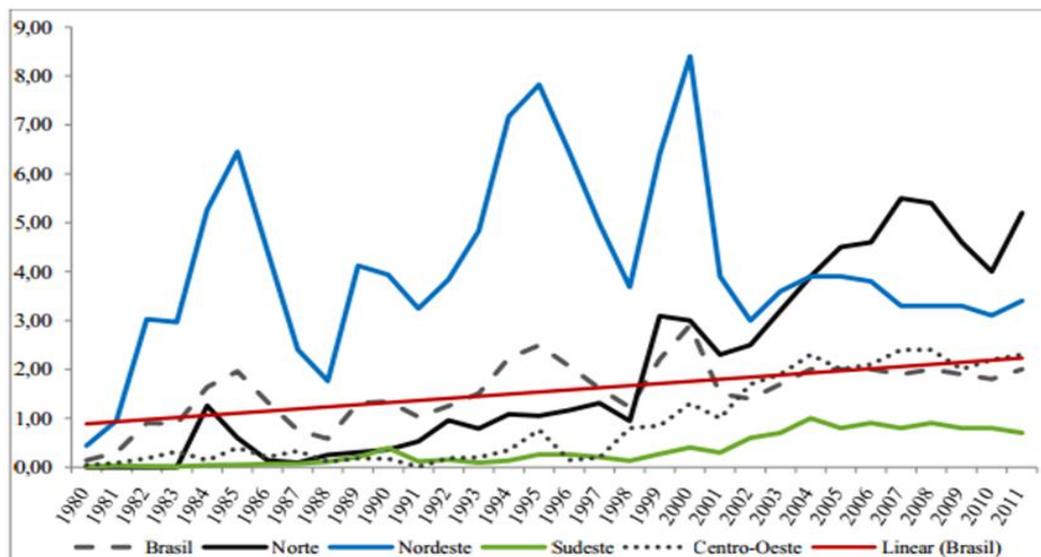
COSTA, 2009; HARHAY *et al.*, 2011; DANTAS-TORRES *et al.*, 2012). Novos casos da doença estão sendo gradualmente registrados em regiões onde ela não era encontrada (SILVA *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2012; BARATA *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2013). Isso se deve, em parte, à alta capacidade adaptativa do vetor *Lu. longipalpis* (LAINSON; RANGEL, 2005).

Segundo o Ministério da Saúde, na década de 90, cerca de 90% dos casos notificados de LV ocorreram no Nordeste. Todavia, como o percentual de casos vem aumentando em outras regiões, o Nordeste passou a representar de 83% em 2000 para 45% em 2008. As regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste passaram de 17% para 48% (BRASIL, 2010b).

A franca expansão da doença no início da década de 80 no Nordeste permitiu sua disseminação para outras regiões do país como o Sudeste e Centro-oeste. No início do século XXI (anos 2000) os primeiros casos alóctones de LV passam a ser notificados na região Sul do país (Figuras 2 e 3).

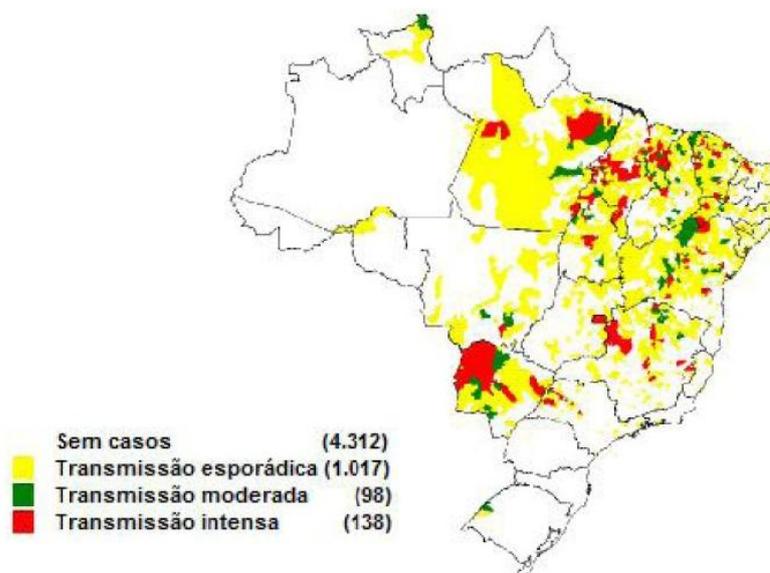


**Figura 2** - Expansão da leishmaniose visceral no Brasil (1983 – 2010). Fonte: Sinan/SVS/MS, 2011b.



**Figura 3** - Incidência de leishmaniose visceral (100.000 habitantes) no Brasil e Regiões (1980 a 2011). Fonte: Sinan/SVS/MS, 2011b.

Dados recentes de LV em áreas com transmissão no Brasil já assinalam casos autóctones de LV, no Rio Grande do Sul, fronteira com a Argentina sendo possível observar que todas as regiões do país apresentam incidência da doença (BRASIL, 2011b). Os fatores que favorecem a urbanização da LV são principalmente, a redução dos investimentos em saúde e educação e falhas nas ações de controle da doença (CERBINO-NETO; WERNECK; COSTA, 2009; COURA-VITAL *et al.*, 2011).



**Figura 4** - Mapa das áreas com transmissão de LV no Brasil, no período de 2009 a 2011. Fonte: Sinan/SVS/MS, 2011b.

Atualmente, a doença atinge as cinco regiões brasileiras, estando presente em 26 das 27 unidades federadas (UF). Ainda os casos estão mais concentrados na

região Nordeste, seguida pelas regiões Norte, Sudeste, Centro-Oeste e Sul (BRASIL, 2014) (Tabelas 1 e 2). Entre os anos de 2004 e 2012 o estado de Minas Gerais foi o que apresentou maior percentual de novos casos da doença (13,79%), corroborando com as pesquisas que indicam novos focos de doença nas regiões antes não acometidas pela LV (Tabela 3).

Inúmeros fatores podem ter contribuído para a dispersão geográfica da LV no Brasil, entre eles o movimento de cães entre áreas endêmicas e não endêmicas, e mudanças na ecologia do vetor. O vetor da LV está disseminado pelo Brasil e encontra-se adaptado para colonizar o meio ambiente modificado pelo homem. Isso significa que a introdução de cães infectados em áreas não endêmicas, onde existam potenciais vetores, podem resultar em um novo foco da doença (THOMAZ-SOCCOL, 2009; DANTAS-TORRES, 2009).

**TABELA 1 - TAXA DE OCORRÊNCIA DE NOVOS CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL (CASOS POR 100.000 HABITANTES) POR REGIÃO DO BRASIL NO PERÍODO DE 2004 A 2012.**

<b>Região</b>	<b>Novos casos</b>	<b>Percentual (%)</b>
Região Nordeste	15827	50,7
Região Norte	6301	20,2
Região Sudeste	6292	20,1
Região Centro-Oeste	2789	8,9
Região Sul	43	0,1
<b>Total</b>	<b>31252</b>	<b>100</b>

FONTE: MS/SVS. Indicadores de morbidade – Leishmaniose Visceral. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/d0205.def>. Acesso: 02 abril de 2014.

**TABELA 2 - CASOS CONFIRMADOS DE LV HUMANA SEGUNDO REGIÃO DO BRASIL NO ANO DE 2013.**

<b>Região</b>	<b>Casos confirmados</b>	<b>Percentual (%)</b>
Região Nordeste	679	48,0
Região Norte	299	21,1
Região Sudeste	258	18,2
Região Centro-Oeste	177	12,6
Região Sul	2	0,1
<b>Total</b>	<b>1415</b>	<b>100</b>

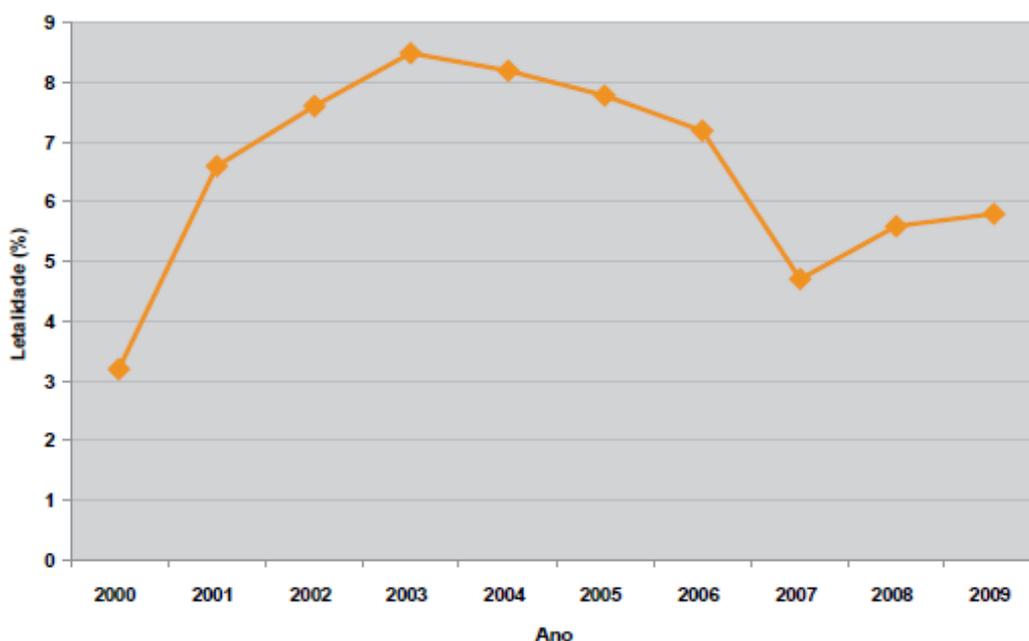
FONTE: MS/SVS. Indicadores de morbidade – Leishmaniose Visceral. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinanet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>. Acesso: 02 abril de 2014.

**TABELA 3 - TAXA DE OCORRÊNCIA DE NOVOS CASOS (CASOS POR 100.000 HABITANTES) DA LV POR UNIDADE FEDERADA SEGUNDO LOCAL DE RESIDÊNCIA NO PERÍODO DE 2004 A 2012.**

<b>Unidade Federada</b>	<b>Novos casos</b>	<b>Percentual (%)</b>
Rondônia	9	0,03
Amazonas	9	0,03
Roraima	79	0,25
Pará	3191	10,21
Amapá	4	0,01
Tocantins	3009	9,63
Maranhão	4089	13,09
Piauí	2024	6,48
Ceará	4182	13,37
Rio Grande do Norte	683	2,19
Paraíba	280	0,90
Pernambuco	694	2,22
Alagoas	354	1,13
Sergipe	453	1,45
Bahia	3068	9,82
Minas Gerais	4311	13,79
Espírito Santo	28	0,09
Rio de Janeiro	29	0,09
São Paulo	1924	6,15
Paraná	22	0,07
Santa Catarina	8	0,03
Rio Grande do Sul	13	0,04
Mato Grosso do Sul	2030	6,50
Mato Grosso	382	1,22
Goiás	277	0,89
Distrito Federal	100	0,32
<b>Total</b>	<b>31252</b>	<b>100</b>

FONTE: Indicadores de morbidade de Leishmaniose Visceral. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/d0205.def>. Acesso: 02 abril de 2014.

No período de 2003 a 2009, a média anual de casos de LV registrados no país foi de 34.583. No Brasil até 2009, a transmissão autóctone de LV foi registrada em mais de 1.600 municípios, com incidência média anual de 1,9 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2010a). A letalidade subiu de 3,1% em 2000, para 5,5% em 2008, o que representou aumento de 61,8% (Figura 5). A letalidade média dos últimos anos foi de 6,3%, atingindo principalmente crianças com menos de 1 ano e com 50 anos ou mais de idade (BRASIL, 2009).



**Figura 5** - Letalidade da LV no Brasil no período de 2000 a 2009. Fonte: BRASIL, 2011b

No Brasil, até o ano de 2008, as áreas de transmissão estavam em outras unidades federadas, não ocorrendo na região Sul. No entanto, houve os primeiros casos autóctones da doença registrados no Rio Grande do Sul, primeiramente em cães (2008), com registro concomitante do vetor (2008) e no ano seguinte em humanos (2009), passando o estado do Rio Grande do Sul a ser área de transmissão autóctone desse agravo (Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, 2009; DEBONI; BARBOSA; RAMOS, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2013). No estado de Santa Catarina, foram registrados apenas casos de LV em cães na região de Florianópolis (FIGUEIREDO *et al.*, 2012; STEINDEL *et al.*, 2013), sem no entanto, ter registro do vetor. No estado do Paraná cães com sinais clínicos compatíveis com LV foram descritos, infectados por *L. infantum*, mas, sendo alóctones (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009). Apenas recentemente, o parasito foi isolado em cães com transmissão autóctone no estado do Paraná (DIAS *et al.*, 2013). Segundo o Ministério de Saúde foram registrados 12 casos de LV em humanos (BRASIL, 2012) (Tabela 4). Todavia, segundo a Secretaria de Saúde do estado do Paraná todos seriam casos alóctones, não tendo sido ainda registrado nenhum caso de LV em humanos com transmissão local.

**TABELA 4 - TAXA DE OCORRÊNCIA DE CASOS CONFIRMADOS NOTIFICADOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA SEGUNDO UNIDADE FEDERADA NA REGIÃO SUL DO BRASIL NO PERÍODO DE 2010 A 2013.**

Unidade Federada	Número de novos casos detectados durante o ano			
	2010	2011	2012	2013
Paraná	5	2	5	-
Santa Catarina	-	2	2	-
Rio Grande do Sul	2	2	-	2
Total	7	6	7	2

FONTE: MS/SVS. Indicadores de morbidade de Leishmaniose Visceral. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>. Acesso em 02 abril de 2014.

Com relação à LV nos países vizinhos, que fazem fronteira com o país, destaque é dado para o Paraguai e Argentina. Em 2000, foi identificado o primeiro caso humano autóctone de LV em Assunção, Paraguai. Nos anos seguintes foram identificados casos humanos, inúmeros casos caninos e confirmou-se a presença do vetor *Lu. longipalpis* no Paraguai (CANESSE, 2000; COUSIÑO, 2006). Também há relatos prévios de casos autóctones de LV em algumas províncias argentinas como Corrientes e Misiones. No entanto, a doença não era considerada endêmica e também não haviam casos humanos descritos no Sul do Brasil. Mais tarde, em 2006, houve um surto de LV na Argentina, com a notificação do primeiro caso autóctone na cidade de Posadas, (Misiones) em uma criança de oito anos (SALOMON *et al.*, 2008). Desde então, vários casos humanos foram notificados no norte da Argentina e nas províncias argentinas que fazem fronteira com o Brasil (Corrientes e Misiones), inclusive com a ocorrência de óbitos (DESCHUTTER *et al.*, 2009; BARRIO *et al.*, 2012; GOULD *et al.*, 2013).

De acordo com o Ministério da Saúde da Argentina, existe em Santo Tomé (Corrientes), fronteira com o município brasileiro de São Borja, no Rio Grande do Sul intensa transmissão de *L. infantum*, e em Monte Caseros, na mesma província, há transmissão moderada. Além disso, mais sete localidades estão classificadas como vulneráveis, sendo seis na província de Corrientes (Alvear, La Cruz, Curuzu, Bella Vista, Paso dos Libres e São Caetano) e uma em Misiones (Puerto Iguazu) (BRASIL, 2010a). Segundo o Ministério da Saúde da Argentina, o primeiro caso canino da doença registrado em Santo Tomé (Corrientes), fronteira com o município brasileiro de São Borja, ocorreu em outubro de 2008, ou seja, um mês antes do

registro do primeiro caso canino no município brasileiro (BRASIL, 2010a). A partir dessa data, os primeiros casos autóctones de LV canina foram registrados no Rio Grande do Sul (fronteira com a Argentina) (TARTAROTTI *et al.*, 2011, TEIXEIRA *et al.* 2013).

Do ponto de vista epidemiológico, as mudanças ambientais como aquecimento global, tempestades, crescimento demográfico e o deslocamento de animais e seres humanos são fatores que contribuem para a modificação da distribuição biogeográfica das leishmanioses, assim como para a incorporação de novos hospedeiros (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2007). Em grande parte dos locais onde existe elevada transmissão de LV, tanto humana quanto canina, as condições sócio-econômicas da população são precárias. Uma rápida e desorganizada urbanização nas periferias das cidades com habitações inadequadas, ausência de estrutura sanitária, aglomerado populacional, presença de potenciais criadouros de flebotomíneos em quintais e presença de animais domésticos nas residências são fatores que favorecem a expansão da doença. Mais ainda, a redução dos investimentos em saúde e educação, e falhas nas ações de controle da doença auxiliam na urbanização da LV (CESSE *et al.*, 2001; CERBINO-NETO; WERNECK; COSTA, 2009; COURA VITAL *et al.*, 2011).

No entanto, as principais condições de transmissibilidade da LV estão correlacionadas à adaptação do vetor aos ambientes modificados pelo homem e à presença de fontes de infecção. Nesse contexto, o cão doméstico é considerado o principal reservatório do parasito e um fator de risco para a ocorrência de LV em humanos (CESSE *et al.*, 2001; MORENO *et al.*, 2005; BORGES *et al.*, 2009). No Nordeste do Brasil, foi constatado que 67% dos pacientes humanos com LV possuíam animais em casa quando adoeceram (CESSE *et al.*, 2001). A presença de matéria orgânica favorece a atração e a manutenção do vetor no ambiente (FELICIANGELI, 2004; LAINSON; RANGEL, 2005). A presença dos cães pode duplicar o risco da doença nos seres humanos, em casas com animais portadores de LV a chance dos moradores se infectarem foi cerca de cinco vezes maior do que naquelas habitações com animais não infectados (FAYE *et al.*, 2011). A presença de mata ou de muita vegetação nas proximidades das residências também pode ser um fator de risco para a ocorrência de leishmaniose visceral canina (BARBOSA *et al.*, 2010; BIGELI; OLIVEIRA JUNIOR.; TELES, 2012). A ausência de rede de esgoto e a coleta de lixo inadequada também podem estar associadas à manutenção da

infecção por *L. infantum* em áreas urbanas, pois tornam o ambiente propício ao desenvolvimento de formas imaturas e à manutenção do vetor no ambiente (ALMEIDA; MENDONÇA; SOUSA, 2010; FERNÁNDEZ *et al.*, 2010; BIGELI; OLIVEIRA JUNIOR.; TELES, 2012).

#### 4 ASPECTOS CLÍNICOS DA LV CANINA

Com base nos sinais clínicos, a LV canina pode ser classificada em três formas:

- 1- assintomática - com ausência de sinais clínicos sugestivos de infecção por *Leishmania* (BRASIL, 2006);
- 2- oligossintomática - cujos hospedeiros apresentam alguns sinais clínicos como, por exemplo, moderada perda de peso, lesões de pele e/ou pelo opaco (BRASIL, 2006);
- 3- sintomática - com vários sinais patognomônicos da doença já aparentes, incluindo onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite, paresia dos membros posteriores (MANCIANTI *et al.*, 1988; BRASIL, 2006).

Os sinais clínicos iniciais da LV canina são: enfartamento do linfonodo, conjuntivite, dermatites, pelagem opaca, hipertermia e edema de patas (FERNÁNDEZ-COTRINA *et al.*, 2013). Os outros sinais mais observados são: perda de peso, anemia, lesões cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, lesões ulcerativas e hiperqueratose), onicogribose, hepato-esplenomegalia, embora não necessariamente estejam presentes em todos os animais (LINHARES *et al.*, 2005; BANETH *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2009). Em estágios mais avançados, observa-se também paresia das patas posteriores, caquexia, inanição, evoluindo para a morte (BRASIL, 2006; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007). Ainda, a doença pode estar associada a infecções bacterianas, o que torna o caso mais grave (COSTA, 2011; CORTES *et al.* 2012).

Embora o parasito ocasione normalmente uma doença sistêmica crônica, dependendo das diferenças na infecção e imunocompetência do hospedeiro a evolução pode ser aguda e grave, levando à morte do animal (CAMPOS-PONCE *et al.*, 2005). Mas, as intensidades dos sinais não dependem unicamente de fatores relacionados ao parasito e podem estar relacionados com a idade, a genética, imunidade e o estado nutricional que são fatores determinantes na expressão da enfermidade no organismo animal (DAVIES *et al.*, 2000). Os sinais geralmente tornam-se evidentes em um período que pode variar de três meses a vários anos (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007). A LV canina é um exemplo de disfunção imunológica específica resultante do parasitismo do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) por *Leishmania*. Produz um amplo espectro de manifestações clínicas e imunológicas especialmente em cães que são os reservatórios do parasito

(CAMPOS-PONCE *et al.*, 2005; CHAPPUIS *et al.*, 2007; TAVARES *et al.*, 2009; DANTAS-TORRES *et al.*, 2012).

A importância do cão na epidemiologia da doença não está apenas no fato do mesmo apresentar altas prevalências de infecção quando comparadas à espécie humana, mas também pelo elevado número de animais assintomáticos, que pode chegar a 80% da população infectada (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; BANETH *et al.*, 2008; PALTRINIERI *et al.*, 2010). Dessa forma, a investigação e a avaliação dos cães assintomáticos são de fundamental importância, uma vez que esses servem de fonte de infecção para o vetor e, muitas vezes, deixam de ser identificados numa população devido à ausência de sinais, ou ainda, em função de resultados falso-negativos nos exames sorológicos convencionais devido aos baixos títulos ou ausência de anticorpos (CARDOSO *et al.*, 2007; BANETH *et al.*, 2008).

Em alguns cães a grande variedade de sinais clínicos da doença aparece logo após a infecção. Porém, em muitos animais a infecção segue seu curso de forma assintomática, permanecendo clinicamente inaparente por longos períodos. No primeiro caso, os cães desenvolvem imunidade humoral, podem ser identificados por sorologia, mas são incapazes de desenvolver uma imunidade celular efetiva para controlar o agente patogênico. Por outro lado, os cães que não exibem sinais da doença podem permanecer desta forma por anos ou por toda a vida. No entanto, estudos sugerem que a apresentação de sinais clínicos pode estar relacionada com a imunodepressão após algum tempo de infecção (BANETH *et al.*, 2008; DANTAS-TORRES *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de sintomas inespecíficos e, muitas vezes, tardios contribui para o subdiagnóstico da doença e permite a transmissão do parasito pelo vetor *Lu. longipalpis* para cães e humanos no ambiente doméstico. A alta prevalência de cães assintomáticos sugere que estes animais mantenham o ciclo de transmissão de *L. infantum* na mesma proporção, ou até superior aos cães sintomáticos. Apesar de existirem discordâncias entre autores no que diz respeito à importância epidemiológica de cães assintomáticos, recentemente foi comprovado que cães assintomáticos são altamente competentes para estabelecer a infecção em flebotomíneos, demonstrando o seu papel na manutenção do ciclo epidemiológico do parasito (LAURENTI *et al.*, 2013).

Animais sintomáticos geralmente estão relacionados com elevados níveis de anticorpos e parasitismo tecidual, são cães com maior susceptibilidade e, portanto,

uma apresentação clínica - laboratorial mais grave da doença (REIS *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2009).



**Figura 6** - Alterações clínicas observadas nos animais com leishmaniose visceral da região extremo-oeste de Santa Catarina, Brasil. (A). Cão apresentando emagrecimento, desidratação, apatia, alopecia e lesões pelo corpo (B). Cão desidratado e apático (C). Cão apresentando onicogribose. (D). Cão com emagrecimento acentuado. Fonte: o autor.

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

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

## 5 DIAGNÓSTICO

O processo de controle pela ortotânasia de cães infectados requer métodos de diagnóstico seguros e confiáveis. Entretanto, o desempenho insatisfatório dos métodos de diagnóstico da LV canina tem subestimado o número de cães infectados, o que dificulta o controle da doença. Existe atualmente uma grande variedade de métodos para diagnóstico da LV em cães que empregam diversos antígenos. Porém, ainda não está disponível um antígeno altamente específico e que seja empregado com um método de fácil execução. Por essa razão, o diagnóstico correto da LV canina ainda é um desafio, apesar dos progressos observados no desenvolvimento de vários métodos (MAIA; CAMPINO, 2008).

A complexidade do diagnóstico da LV canina deve à característica sistêmica da doença, sua gama de sinais clínicos inespecíficos e os custos dos exames. A associação de diferentes metodologias e a observação dos sinais clínicos é recomendada para a obtenção do diagnóstico mais seguro. Um teste de diagnóstico eficaz, além de ser capaz de confirmar uma suspeita clínica em um único paciente, deve detectar a infecção em cães assintomáticos, ter alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, deve ser simples, de fácil execução, de baixo custo, viável em laboratórios regionais ou adaptáveis para condições de campo. Idealmente, ele deve detectar todos os cães infectados, utilizando preferencialmente, métodos de coleta de amostras biológicas não invasivas (MAIA; CAMPINO, 2008). No Brasil, o diagnóstico da LV canina é um grande problema para os serviços públicos de saúde, principalmente devido a três fatores: variedade de sinais clínicos e semelhança com outras doenças, alterações histopatológicas inespecíficas e inexistência de um teste diagnóstico aplicável 100% específico e sensível (BRASIL, 2006). Quanto aos métodos disponíveis para o diagnóstico, esses ainda não apresentam a eficácia e aplicabilidade desejadas, embora avanços promissores tenham sido alcançados com os estudos de novas técnicas.

De acordo com Courtenay *et al.* (2002), para o melhor controle da LV canina é necessário o emprego de testes diagnósticos com maior acurácia, que sejam capazes de identificar todos os animais que são fonte de infecção para o vetor, reduzindo efetivamente a transmissão do parasito pelos flebotomíneos.

Segundo Dourado *et al.* (2007), métodos de diagnóstico precisos para LV canina (elevadas sensibilidade e especificidade), de fácil realização e interpretação, que forneçam resultados rápidos, que independam de infra-estrutura laboratorial e de profissionais especializados, têm sido cada vez mais desejados. Ressaltam, no entanto, que a sensibilidade e a especificidade de qualquer técnica diagnóstica são passíveis de alterações durante o curso de uma infecção.

Atualmente, estão disponíveis para o diagnóstico, os exames clínicos, a epidemiologia e os testes laboratoriais diretos e indiretos como: cultura do parasito em meios artificiais, citologia, sorologia, e métodos moleculares, cada um apresentando os seus pontos positivos, mas também os negativos.

Para determinar o exame laboratorial mais adequado é importante que se conheça a área provável de transmissão, o método a ser utilizado, as suas limitações e a sua interpretação clínica (BRASIL, 2006). Fatores importantes devem ser considerados na escolha do teste diagnóstico para LV canina, como a evolução do quadro clínico dos cães infectados, os antígenos e a subclasse da imunoglobulina a ser utilizada na realização do exame imunológico (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

A sensibilidade desses testes é bastante discutível, não havendo concordância entre testes parasitológicos, imunohistológicos e os sorológicos. Atribui-se essa discordância a incapacidade dos testes sorológicos detectarem anticorpos nas várias fases da doença. Tal fato apresenta sérias consequências, pois implica na morte de animais (CABRERA *et al.*, 2003). A sensibilidade e a especificidade da sorologia também dependem do tipo de antígeno empregado (espécie ou forma evolutiva do parasito) e de outros fatores como tempo de incubação ou tipo de microplacas utilizadas (REITHINGER *et al.*, 2002).

De uma forma geral, a utilização da sorologia pode ser questionável, uma vez que animais saudáveis podem ser soropositivos e animais infectados ocasionalmente se tornam soronegativos, dificultando o uso destas técnicas. A sorologia mostra que animais infectados desenvolvem resposta específica de anticorpos, e a proporção de soroconversão entre animais com infecção clínica ou subclínica é desconhecida (CABRAL, 2007). Segundo Ferrer (2002), animais doentes desenvolvem principalmente resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania*. A soroconversão ocorre aproximadamente três meses após a infecção e os títulos permanecem elevados por pelo menos dois anos.

Contudo, a permanência de animais falso negativos no ambiente pode comprometer a eficácia do programa de controle da LV, contribuindo para a manutenção de focos da doença, e conseqüentemente, tornando-se fontes de infecção para o vetor que transmite o parasito para pessoas e outros cães (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

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

Estes fatos sugerem a necessidade de testes mais confiáveis, capazes de identificar a infecção em todas as fases da doença, ou o emprego de uma associação de métodos diagnósticos (COURA-VITAL *et al.*, 2011).

## 5.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Em áreas endêmicas o diagnóstico clínico da LV canina é dificultado pelo fato dos sinais não serem patognomônicos da doença. Desta forma o diagnóstico clínico isoladamente, não é suficiente para identificar um cão infectado, tornando a utilização de exames laboratoriais de extrema importância para confirmação diagnóstica (BRASIL, 2006; CAMARGO; LANGONI, 2006; FREITAS *et al.*, 2012).

## 5.2 MÉTODOS PARASITOLÓGICOS E CULTURAS

A busca microscópica das formas amastigostas ou promastigostas (obtidas em cultivos) permanece como o padrão ouro no diagnóstico da LV por ser altamente específico (SRIVASTAVA *et al.*, 2011). Podem ser obtidas em distensão de aspirado de órgãos/tecidos infectados como linfonodo, medula óssea, pele e sangue, que podem ser corados por Giemsa ou Leishman (BRASIL, 2006; LAURENTI, 2009).

As técnicas de distensão e aposição (*imprint*) são métodos simples, porém requerem profissional capacitado e com experiência (CALVOPINA; ARMIJOS; HASHIGUCHI, 2004; MOHAMMADIHA *et al.*, 2013). A especificidade do método é de aproximadamente 100%, e a sensibilidade depende da densidade parasitária, do tipo de material biológico examinado e do número de campos microscópicos observados, uma vez que o resultado positivo é dado pela observação direta de

formas amastigotas (GONTIJO; MELO, 2004). Em cães sintomáticos a sensibilidade é de aproximadamente 80%, porém, menos sensível em animais assintomáticos (BRASIL, 2006).

Os aspirados de medula e linfonodos são os mais usados para diagnosticar a LV canina. Mas esses métodos podem gerar resultados falso negativos devido ao baixo número de parasitos contidos nas amostras, especialmente em cães assintomáticos (GOMES *et al.*, 2008).

Segundo Calvopina, Armijos e Hashiguchi (2004), a sensibilidade de um exame direto de esfregaço sanguíneo é de cerca de 45%, já de acordo com Montalvo *et al.* (2012), os valores da sensibilidade variam de 50 a 70% no velho mundo e 15 a 30% no novo mundo (MONTALVO *et al.*, 2012). De acordo com SRIVASTAVA *et al.* (2011), os esfregaços do baço possuem a melhor sensibilidade, variando entre 93-98%, já os de medula óssea e linfonodo têm menor sensibilidade com 52-85% e 52-58%, respectivamente. No entanto, a técnica de aspirado de baço é de alto risco, podendo levar o animal a óbito.

Barrouin-Melo *et al.* (2006), utilizando a técnica parasitológica, identificaram amastigotas de *Leishmania* em 83% de 180 cães soropositivos e 23% de 26 soronegativos. É importante lembrar que o método parasitológico apresenta limitações tendo em vista a variação na intensidade do parasitismo, como por dificuldades técnicas e operacionais que possam interferir na obtenção do material, não sendo qualificados para uso em inquéritos caninos (GONTIJO; MELO, 2004; LEAL, 2009). Embora alguns desses procedimentos, ofereçam a vantagem da simplicidade, são métodos invasivos, podendo representar riscos para o animal e também impraticáveis em programas de saúde pública que avalia grande número de animais e devem ser avaliados em curto espaço de tempo.

Apesar do diagnóstico parasitológico realizado a partir de amostras de pele ser considerado como de boa acurácia, a utilização de apenas amostras de pele para a realização dos exames parasitológicos pode permitir que animais infectados não sejam detectados, o que levaria a uma subestimação da prevalência real de infecção da população canina, considerando que a especificidade seria próxima de 100%. O uso de um padrão de referência incapaz de detectar todos os animais infectados pode resultar em uma subestimação da especificidade dos modelos testados, pois amostras com resultados falso negativos no padrão de referência

utilizado poderiam ser detectados como positivos pelos modelos preditivos (MADEIRA *et al.*, 2004; BRASIL, 2006).

O isolamento do parasito pode ser realizado em meios de cultura como o NNN (Novy-McNeal-Nicole), Brain Heart infusion (BHI) e Schneider (Schneider's Drosophila Medium). O isolamento do parasito em cultura também depende da amostra obtida, necessita um profissional experiente e instalações apropriadas, o resultando em alto custo, além de ser uma técnica demorada. O cultivo do parasito ainda pode apresentar variações de sensibilidade e pode ocorrer contaminação microbiológica do material (CALVOPINA; ARMIJOS; HASHIGUCHI, 2004; MOHAMMADIHA *et al.*, 2013). Isso torna o método pouco requisitado para o diagnóstico clínico, sendo utilizada apenas em laboratórios de pesquisa (SRIVASTAVA *et al.*, 2011). Mas seria um método fundamental em campanhas de controle de reservatórios, por sua especificidade. Além disso, permite a identificação e caracterização da espécie por meios de estudos isoenzimáticos ou moleculares (MONTALVO *et al.*, 2012). E, diferentemente da Europa, onde a única espécie de *Leishmania* encontrada nos cães é a *L. infantum*, na América do Sul os cães são parasitados por diversas outras espécies de *Leishmania*, causadoras de leishmaniose na forma cutânea, que epidemiologicamente precisam ser caracterizadas (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012).

### 5.3 MÉTODOS SOROLÓGICOS

No Brasil, a ortotanásia de cães infectados é recomendada pelo Ministério da Saúde como medida de controle da LV, por isso um diagnóstico de baixo custo e alta confiabilidade é necessário para a triagem desses reservatórios. Com a intenção de evitar o uso de métodos invasivos e considerando que a resposta humoral na LV canina é geralmente muito intensa, com altos níveis de imunoglobulinas, o diagnóstico passou a ser focado em métodos sorológicos (GOMES *et al.*, 2008). Assim, diversos métodos sorológicos foram desenvolvidos e são bastante utilizados para o diagnóstico canino.

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

A detecção de altos níveis de anticorpos específicos anti-*Leishmania* no soro está associado com o parasitismo elevado, indicando fonte de infecção para o vetor (MADEIRA *et al.*, 2009; TASCA *et al.*, 2009; BANETH, 2010). Baixos níveis de anticorpos podem ser transitórios e os mesmos podem ser detectados em cães que foram expostos. Todavia, a presença de anticorpo não necessariamente indica infecção. Havendo necessidade de confirmar ou infirmar a presença do parasito por outros métodos diagnósticos, como exame parasitológico ou a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (BANETH, 2010).

O uso de sorologia no diagnóstico rotineiro da doença é praticado por sua facilidade de execução e boa sensibilidade (MOHAMMADIHA *et al.*, 2013). Entre os métodos sorológicos existentes para o diagnóstico da LV canina, destacam-se: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI); Ensaio Imunoenzimático (ELISA), e os testes rápidos imunocromatográficos (DA SILVA *et al.*, 2010; PAVLI; MALTEZOU, 2010; MONTALVO *et al.*, 2012; MOHAMMADIHA *et al.*, 2013). Estes métodos serão analisados individualmente nos itens 5.3.1 a 5.3.3.

Os métodos diagnósticos utilizados em inquéritos epidemiológicos devem possuir alta sensibilidade e especificidade, pois exames com alta sensibilidade permitem detectar o maior número de cães infectados, evitando a permanência de animais positivos na população. Pode-se também evitar que cães não infectados com o parasito sejam ortotansados (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

A hemaglutinação, teste desenvolvido na década de 1980 por Tomizawa (REIS, 1999), permite a detecção de imunoglobulinas contra uma grande variedade de parasitos, dentre eles parasitos do gênero *Leishmania*. Esse método, também denominado de Direct Agglutination Test (DAT) está disponível para o diagnóstico de LV canina. A técnica utiliza promastigotas íntegras, é simples de ser executado e apresenta baixo custo, o que o torna ideal para uso em laboratório e em campo; entretanto, a padronização da técnica e o controle de qualidade do antígeno são bastante complexos (GONTIGO; MELO, 2004). Alguns pesquisadores obtêm elevadas sensibilidades ao utilizar essa técnica, mas os valores de especificidade frequentemente são baixos (CHAPPUIS *et al.*, 2003).

Apesar da grande variedade de testes desenvolvidos, as técnicas RIFI e ELISA ainda são as mais empregadas nos inquéritos epidemiológicos caninos. Provavelmente por reunirem uma série de vantagens como facilidade na execução, rapidez, baixo custo e adequadas sensibilidade e especificidade (MAIA *et al.*, 2009).

A principal desvantagem dos testes sorológicos é a possibilidade de ocorrer reações cruzadas com outras patologias, inclusive diferentes espécies de *Leishmania* (inclusive aquelas responsáveis por causar leishmaniose tegumentar) (IKEDA; FEITOSA, 2006; LUCIANO *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2011). Da mesma forma, os testes sorológicos são incapazes de detectar cães infectados antes da soroconversão e amostras de animais imunocomprometidos podem não responder fielmente aos testes (MOHAMMADIHA *et al.*, 2013).

No Brasil, o Ministério da Saúde e Secretarias de Saúde possuem um Programa de Vigilância e Controle da LV canina que adotam os métodos diagnósticos sorológicos: ELISA como triagem inicial dos cães suspeitos e RIFI como teste confirmatório independente da presença de sinais clínicos nos cães. Entretanto, o programa gradativamente deixou de realizar o método RIFI, passando a utilizar um teste rápido imunocromatográfico como prova de triagem e ELISA como teste confirmatório (BRASIL, 2011a).

Falhas nesses resultados podem causar a eliminação de um número desconhecido de animais não infectados, e, por outro lado, não detectar casos positivos. O que é visível entre as duas rotinas diagnósticas, é que para um diagnóstico confiável da LV canina, não se deve utilizar apenas uma técnica, e sim a combinação de metodologias (MAIA; CAMPINO, 2008). Devendo-se procurar o máximo de suporte laboratorial para obter conclusões precisas.

### **5.3.1 Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI**

A Reação de Imunofluorescência Indireta começou a ser utilizada a partir da década de 1960 (DUXBURY; SADUN, 1964), é uma metodologia considerada como padrão ouro do diagnóstico sorológico, utilizando como antígeno, promastigotas de várias espécies do gênero *Leishmania* fixadas em lâmina para microscopia.

O primeiro passo, para a realização da técnica de RIFI ocorre quando os antígenos fixados em lâmina são recobertos com diluições de soros caninos a serem testados e soros controles. Logo após a primeira incubação, realizam-se várias lavagens. Em uma etapa subsequente, o complexo antígeno-anticorpo é recoberto pela adição de anti-imunoglobulina canina conjugada (anticorpo anti-IgG de cão conjugado) marcada com isotiocianato de fluoresceína. Após a segunda incubação e novas lavagens, as lâminas são montadas com glicerina tamponada e recoberto por

lamínula. Nesta etapa a reação entre o antígeno fixado e o anticorpo presente nas amostras é visualizada em microscópio equipado com luz fluorescente. O resultado é considerado positivo quando os parasitos exibem fluorescência verde homogêneo em todo contorno das formas promastigotas (OLIVEIRA *et al.*, 2005; BRASIL, 2006; MAIA; CAMPINO, 2008; MIRÓ *et al.*, 2008; LEAL, 2009). O título corresponde à maior diluição do soro onde se verifica a emissão de fluorescência e o limiar de positividade ou “*cut-off*” para distinguir resultados positivos e negativos varia entre 1:40 e 1:60 (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

A imunofluorescência é um dos testes mais sensíveis. No entanto, um resultado negativo não exclui que o animal esteja infectado, uma vez que há animais que demoram algum tempo para desenvolver a resposta humoral e atingir títulos de anticorpos considerados positivos (LUCIANO *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011). Assim, em animais clinicamente suspeitos ou com resultados duvidosos deve-se repetir o teste após 4 a 6 semanas ou recorrer a outro tipo de teste (BRASIL, 2006; MOHAMMADIHA *et al.*, 2013). A sensibilidade da técnica varia de 83 a 100% e sua especificidade é de aproximadamente 80% para amostras de soro (ALMEIDA; JESUS; SOUSA-ATTA, 2005; LIRA, 2005). Figueiredo *et al.* (2010), em estudo conduzido do Rio de Janeiro com 305 cães, encontraram sensibilidade e especificidade na imunofluorescência (ponto de corte 1:40) de 100% e 65,5%.

A RIFI é uma técnica útil em inquéritos soropidemiológicos, na prática clínica e no seguimento do tratamento. No entanto, apresenta várias limitações como requerer alto nível de habilidade e experiência técnica, instalações laboratoriais adequadas e diluições de soro seriadas, o que a torna trabalhosa (MAIA; CAMPINO, 2008). Ainda assim, a técnica de imunofluorescência é indicada como referência pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o diagnóstico sorológico da LV canina (GRADONI; GRAMICCIA, 2000), sendo o teste de eleição para inquéritos epidemiológicos, por apresentar sensibilidade e especificidade adequadas (ALVES; BEVILACQUA, 2004; FRAGA *et al.*, 2012).

### **5.3.2 Ensaio Imunoenzimático - ELISA**

A partir da década de 1970 (ENGVALL; PERLMANN, 1971) iniciou-se o uso dos testes imunoenzimáticos (ELISA - Enzyme Linked Imunosorbent Assay), assim como suas variações. Consiste em uma reação imunoenzimática para detecção de

imunoglobulinas específicas no soro, utilizando como antígeno extratos solúveis de promastigota ou amastigota do parasito. Esse antígeno é adsorvido em microplacas e os soros diluídos (controle do teste e das amostras) são adicionados posteriormente. A presença de anticorpos específicos no soro vão se fixar aos antígenos. A visualização da reação ocorre, quando adicionada uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase e cromógeno, que se ligará aos anticorpos específicos (caso estejam presentes) e gera uma reação de cor que poderá ser medida por espectrofotometria. O resultado considerado soro reagente é aquele que apresente o valor da absorbância igual ou superior ao ponto de corte (“*cut-off*”) estabelecido pelo laboratório que realiza o teste (BRASIL, 2006).

Lima *et al.* (2010), comparando o desempenho de diferentes técnicas de diagnóstico em cães sintomáticos para LV, obtiveram sensibilidade e especificidade para a técnica ELISA de 100% e 91,2%, respectivamente. Figueiredo *et al.* (2010), em estudo desenvolvido do Rio de Janeiro com 305 animais, também encontraram resultados semelhantes de sensibilidade e especificidade da técnica, 100% e 96,6%, respectivamente.

O teste ELISA é bastante útil para análises de laboratório, possibilitando avaliar grande quantidade de amostras em pouco tempo (leitor automatizado), sendo, por isso, um teste mais rápido e de fácil execução quando comparado à RIFI (CAMARGO; LANGONI, 2006; MAIA; CAMPINO, 2008). O teste ELISA permite detectar baixos títulos de anticorpos e é acurado na identificação de casos assintomáticos (CÂNDIDO *et al.*, 2008). É facilmente adaptado para uso com diversos antígenos desde extrato bruto do parasito quanto antígenos purificados, como os recombinantes. Tem boa sensibilidade e especificidade e as possíveis reações cruzadas podem ser minimizadas pelo uso desses antígenos purificados (DOURADO *et al.*, 2007; MAIA; CAMPINO, 2008; LEAL, 2009).

Segundo Mettler *et al.* (2005), o teste ELISA tem sido capaz de detectar anticorpos em animais com e sem sinais clínicos, enquanto a RIFI detecta anticorpos, na maioria, em animais com manifestações clínicas aparentes. Parte das dificuldades diz respeito à sensibilidade e especificidade dos atuais testes sorológicos utilizados na rotina laboratorial (RIFI e ELISA) para caracterizar infecção e doença, além da possibilidade de ocorrer reações cruzadas com outros parasitos (LOPES *et al.*, 2011; MONTALVO *et al.*, 2012).

### 5.3.3 Testes Imunocromatográficos

A imunocromatografia foi desenvolvida na década de 1990 quando foram reunidas as técnicas imunoenzimáticas com a cromatografia (DOURADO *et al.*, 2007). A partir daí, vários testes imunocromatográficos foram desenvolvidos, utilizando como antígenos proteínas recombinantes e também proteínas extraídas de bactérias, que fazem parte dos reagentes marcadores dos testes para o diagnóstico da LV humana (CHAPPUIS *et al.*, 2006; WELCH; ANDERSON; LITWIN, 2008) e canina (REITHINGER *et al.*, 2002; BISUGO *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2010). A grande maioria dos testes imunocromatográficos emprega antígenos de *Leishmania* de diferentes fontes adsorvidos em membranas de nitrocelulose e anticorpos monoclonais anti-IgG de cão (GRADONI, 2002). A presença de anticorpos anti-rK26 ou rK39 indicam infecção (BISUGO *et al.*, 2007).

Dentre as novas tecnologias empregadas para a determinação qualitativa de anticorpos para antígenos recombinantes de *L. infantum* existem os seguintes testes: Kalazar Detect™ Rapid Test (Kalazar DetectR In Bios International Seattle, WA, USA), DiaMed IT-LEISHR (DiaMed AG Cresiersur Morat, Suíça, distribuído pela DiaMed Latino America S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) e o Dual Path Platform (DPP®), Chembio Diagnostics, Biomanguinhos/Fiocruz (FUNED, 2010).

Para o diagnóstico sorológico da LV canina destaca-se o teste rápido Dual Path Platform (TR-DPP - Leishmaniose Visceral Canina), patenteado pela Chembio Diagnostics e desenvolvido pelo Instituto Biomanguinhos/Fiocruz (FUNED, 2010). Trata-se de um ensaio imunocromatográfico qualitativo de triagem para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que emprega a proteína recombinante K39 (rK39) como antígeno. Esta proteína é o produto de um gene clonado a partir de *L. infantum* e que contém uma repetição de 39 aminoácidos conservados entre as espécies viscerotrópicas de *Leishmania*. Se houver a presença de anticorpos anti-*Leishmania* na amostra testada, estes reagirão com os antígenos recombinantes, e em sequência se ligarão a combinação de proteína A e ouro coloidal, fornecendo o resultado positivo por meio de reação de cor.

Para o diagnóstico da LV canina, o antígeno rK39 foi avaliado em ensaios imunocromatográficos realizados com amostras de cães provenientes do Município de Capitão Enéas, estado de Minas Gerais, apresentando sensibilidade que variou entre 72 e 77% e especificidade que variou entre 61 e 75% (REITHINGER *et al.*,

2002). Outro estudo conduzido também em Minas Gerais forneceu melhores resultados, com sensibilidade entre 94 e 96% e especificidade de 100%, em teste realizado em 50 amostras de soro canino (COSTA *et al.*, 2003).

Em 2012, Grimaldi *et al.* avaliam o teste rápido DPP®, e observam especificidade de 96%. Com relação à sensibilidade, os autores obtiveram valores de 98% para cães sintomáticos e 47% para assintomáticos. Os autores mostram a necessidade de testes mais sensíveis para detecção de maior número de animais infectados. Outros estudos com testes imunocromatográficos que utilizam o antígeno recombinante rK39 em cães apresentaram sensibilidade de 72-97% e especificidade de 61-100% (BISUGO *et al.*, 2007; LEMOS *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2010).

Em estudo encomendado pelo Ministério da Saúde, o teste rápido imunocromatográfico de plataforma de duplo percurso (DPP®), em uma população cuja prevalência de infecção era de 7,0%, apresentou uma sensibilidade de 91% e especificidade de 70% (LIMA-JUNIOR, 2012). Neste mesmo estudo observou-se como o melhor cenário diagnóstico, tanto do ponto de vista de qualidade quanto de praticidade, o protocolo utilizando o teste rápido DPP® para triagem nos inquéritos caninos para LV e o ELISA como teste confirmatório, levando o Ministério da Saúde a substituir a partir do ano de 2012 o protocolo diagnóstico anteriormente utilizado (BRASIL, 2011a).

As principais vantagens e facilidades dos testes imunocromatográficos são o baixo custo, a rapidez, simplicidade e praticidade, poder ser realizado a partir de uma pequena amostra de sangue total, ser dotado de elevada sensibilidade, não exigir equipamentos laboratoriais específicos, especialização tecnológica e ainda permitir que a execução seja feita na frente do proprietário do animal (LIMA *et al.*, 2010; BIO-MANGUINHOS, 2011; GRIMALDI *et al.*, 2012). Queiroz Júnior (2011) refere que o uso do DPP® pode ser um recurso para obtenção de resultados mais eficientes, precisos e confiáveis no diagnóstico da LV canina. De acordo com Lima-Junior (2012), apesar de suas vantagens, este novo protocolo diagnóstico ainda não solucionará o problema enfrentado com a demora no controle dos animais infectados, principalmente em áreas remotas, onde há a necessidade de se enviar as amostras para a realização do exame confirmatório em laboratórios de referência, localizados em outros municípios.

Neste contexto, o desenvolvimento de um sistema de predição para LV canina, combinando informações clínicas com o resultado do teste rápido poderia

contribuir para a melhoria do diagnóstico da LV canina em áreas endêmicas, aumentando a acurácia e a agilidade diagnóstica em campo. Adicionalmente, permitiria identificar uma parcela importante de cães com maior potencial de infectividade, promovendo um impacto significativo na redução da transmissão (LIMA-JUNIOR, 2012).

#### 5.4 TÉCNICAS MOLECULARES

Após a década de 1980, foram desenvolvidas diversas técnicas de biologia molecular para detectar e identificar parasitos do gênero *Leishmania*, sem a necessidade de se isolar o parasito em cultura (GONTIGO; MELO, 2004).

A técnica baseia-se na amplificação *in vitro* de sequências de nucleotídeos específicas presentes no parasito, sendo um método bastante sensível e específico para detectar quantidades mínimas de DNA de *Leishmania* spp. em ampla variedade de amostras clínicas (SILVA *et al.*, 2008; DANTAS-TORRES *et al.*, 2012). É importante observar as condições ideais de concentração dos componentes da reação, pois não existe um protocolo padrão que possa ser usado para todas as amplificações.

A procura por um novo teste padrão ouro no diagnóstico da LV canina tem sido estimulada pela chegada de métodos moleculares altamente sensíveis e específicos. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é a técnica que mais vem sendo utilizada em trabalhos sobre diagnóstico da LV (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2007), demonstrando bons resultados em estudos com cães, flebotomíneos e humanos (SILVA *et al.*, 2008). No entanto, para realização de estudos epidemiológicos de larga escala, a colheita de material de medula óssea ou aspirado de gânglio não é uma técnica simples de executar. A sensibilidade e a especificidade da técnica dependem de inúmeros fatores como a escolha dos primers, a quantidade de DNA amplificado, o protocolo de extração de DNA, e da origem da amostra que será analisada (LACHAUD *et al.*, 2002; BANETH; AROCH, 2008). A maioria dos estudos mostra que a técnica apresenta elevada sensibilidade (acima de 90%) e especificidade diagnóstica de até 100% (LACHAUD *et al.*, 2002; DISCH *et al.*, 2003; IKEDA-FEITOSA *et al.*, 2006; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

Em amostras de sangue, apesar da vantagem de ter uma coleta menos invasiva, a sensibilidade mostra-se inferior àquela obtida com outros tecidos. A

vantagem do uso de sangue como amostra é que sua extração se torna menos invasiva (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). No entanto, a carga parasitária neste tecido tende a ser menor, além de conter certos inibidores de PCR que podem afetar a sensibilidade da técnica (REITHINGER *et al.*, 2002).

Resultados variáveis e conflitantes com relação à sensibilidade da PCR podem ser observados em diferentes amostras biológicas de cães. A distribuição heterogênea dos parasitos em cada tecido, devido ao tropismo da cepa e também à resposta imune local, pode explicar tais variações. Quinell *et al.* (2001) demonstraram, em estudo longitudinal com cães naturalmente infectados, que a sensibilidade da PCR era mais elevada logo após a infecção; posteriormente, declinou à metade. A pele tem sido um dos tecidos mais utilizados e apresenta como vantagens, além do alto parasitismo, a facilidade de obtenção e a distribuição homogênea de parasitos independente da região do corpo na qual foi coletada.

Comparando métodos diagnósticos em um grupo de cães naturalmente infectados, Assis *et al.* (2010), concluíram que a PCR foi o teste mais sensível e preciso no diagnóstico da LV canina, confirmando o resultado positivo pelas outras técnicas e detectando DNA do parasito nos tecidos (linfonodo, baço e fígado) em 100% dos negativos. Os dados de Moreira *et al.* (2007), também corroboram estes resultados. Por outro lado, Sasaki *et al.* (2011), encontraram melhor resultado em animais infectados utilizando a RIFI, seguido da PCR de aspirado de linfonodo.

Uma vantagem da técnica de PCR é na identificação e caracterização das espécies de *Leishmania*, assim como na detecção do DNA do parasito antes da soroconversão (PEREIRA *et al.*, 2008; SZARGIKI *et al.*, 2009). Dessa forma, tem-se observado em área endêmica, alta prevalência de animais assintomáticos soronegativos, apresentando resultados moleculares positivos (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; LACHAUD *et al.*, 2002; BRASIL, 2003). No início da infecção, antes da soroconversão e/ou desenvolvimento de sintomas, a PCR mostra-se mais sensível que a sorologia; com a progressão da doença há uma elevação nos títulos de anticorpos e os testes sorológicos têm sua sensibilidade aumentada (QUINNELL *et al.*, 2001). Em casos suspeitos, mas em que as técnicas sorológicas ou a observação direta do parasita são inconclusivas, indica-se a PCR (MANNA *et al.*, 2007). Porém, não se sabe se os animais soronegativos e PCR positivos são imunologicamente resistentes ou ainda vão desenvolver a doença. No entanto, pode-se afirmar que tiveram contato com o parasito (COURA-VITAL *et al.*, 2011).

Segundo Solano-Gallego *et al.* (2001), a aplicação conjunta da técnica de PCR e testes sorológicos permitem melhor discriminar a extensão da infecção subclínica da LV canina em áreas endêmicas, bem como estimar o número de cães que será alvo das medidas de controle. Os autores reforçam ainda, que a presença de DNA de *Leishmania* no sangue ou outros tecidos de animais clinicamente saudáveis que vivem em áreas endêmicas indica a presença de cães com a infecção, mas que eles poderão nunca vir a desenvolver a doença clínica. Em contraste, um título de anticorpos elevado pode indicar que um cão infectado pode desenvolver uma infecção generalizada e futura doença clínica.

A alta sensibilidade e especificidade, a habilidade de detectar e identificar o protozoário envolvido, e o fato de poder ser aplicada em várias amostras clínicas ao mesmo tempo são vantagens indiscutíveis da PCR em relação aos métodos de diagnóstico tradicionais, tornando-a uma técnica promissora para o diagnóstico da LV (DENIAU *et al.*, 2003).

Dentre as mais sofisticadas técnicas para o diagnóstico da LV, destacam-se além da PCR convencional, a nested PCR e a PCR em tempo real quantitativa (qPCR) (GOMES *et al.*, 2008; MAIA *et al.*, 2009). Mohammadiha *et al.* (2013) afirmam que o DAT e a qPCR, são dois testes adequados para o diagnóstico de animais assintomáticos infectados com *L. infantum*. Oportunamente, a qPCR possibilita análise quantitativa do resultado, o que é útil para distinção da infecção.

A qPCR vem ganhando espaço entre as técnicas de diagnóstico de LV, permitindo o monitoramento das amplificações das sequências específicas de DNA durante o decorrer da reação e possibilitando a eliminação da etapa laboriosa pós-amplificação (preparo do gel para eletroforese), necessária para visualizar o produto amplificado na PCR convencional (MAIA; CAMPINO, 2008; PAIVA-CAVALCANTI; REGIS-DA-SILVA; GOMES, 2010; MOHAMMADIHA *et al.*, 2013).

Testes moleculares baseado na PCR conhecidamente possuem bons índices de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico (CALVOPINA; ARMIJOS; HASHIGUCHI, 2004; DANTAS-TORRES *et al.*, 2012). Contudo, a qPCR proporciona valores de sensibilidade e especificidade próximos à 98% e 83%, respectivamente, sendo capaz de detectar a infecção em 99% dos animais assintomáticos. Além disso, tem como vantagem a possibilidade de produzir resultados rapidamente, reduzindo as chances de contaminação laboratorial e obtenção de resultados falso positivos (MOHAMMADIHA *et al.*, 2013). Os resultados da qPCR tornam-se

extremamente importantes quando se busca um diagnóstico sensível e rápido, particularmente em casos onde os diagnósticos sorológicos são duvidosos. Assim, pode-se observar inúmeras vantagens da qPCR em relação à PCR convencional, incluindo, rapidez na obtenção dos resultados e reprodutibilidade (GOMES *et al.*, 2008). Infelizmente, o custo elevado dos métodos moleculares não permite que sejam realizados de forma rotineira, por requerer laboratórios bem equipados e habilidade técnica ímpar (BRASIL, 2006).

Na tabela 5 são relatados trabalhos que usam diferentes técnicas para o diagnóstico de LV canina com vantagens e desvantagens de cada uma delas.

**TABELA 5 - VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA A DETECÇÃO DE *L. infantum* EM CÃES.**

<b>TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO</b>	<b>VANTAGENS</b>	<b>DESVANTAGENS</b>	<b>AUTOR, ANO</b>
<b>Sorologia (RIFI / ELISA)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinação dos níveis de anticorpos, essencial para o diagnóstico e estabelecimento de prognóstico</li> <li>• Altos níveis de anticorpos na presença de sinais clínicos compatíveis e/ou anormalidades clínico-patológicas são conclusivas para leishmaniose clínica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não detecta a presença atual de <i>Leishmania</i></li> <li>• Reações cruzadas</li> <li>• Desempenho e acurácia do “cut-off” dependem do laboratório</li> <li>• Diferenças entre laboratórios e padronização não adequada das técnicas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MADEIRA <i>et al.</i>, 2009</li> <li>• MAIA <i>et al.</i>, 2009</li> <li>• BANETH, 2010</li> <li>• PALTRINIERI <i>et al.</i>, 2010</li> <li>• MONTALVO <i>et al.</i>, 2012</li> </ul>
<b>Imunocromatografia (Testes Rápidos)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resultado rápido</li> <li>• Independe de infraestrutura laboratorial</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promove resultado positivo ou negativo</li> <li>• Sensibilidade e desempenho variáveis com risco de falso negativos</li> <li>• Um resultado positivo precisa ser futuramente avaliado por sorologia quantitativa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PALTRINIERI <i>et al.</i>, 2010</li> <li>• SRIVASTAVA, 2011</li> <li>• SOLANO-GALLENO <i>et al.</i>, 2011</li> <li>• COURA-VITAL <i>et al.</i>, 2014</li> </ul>
<b>Citologia / Histopatologia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite detecção direta do parasita e o tipo de achado patológico: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Achado patológico suspeito de infecção</li> <li>- Permite exclusão de outros diagnósticos diferenciais</li> <li>- Rápido e não invasivo (citologia)</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixa sensibilidade para a detecção de amastigotas de <i>Leishmania</i> em tecidos e fluidos do corpo</li> <li>• Requer outro teste diagnóstico como imunohistoquímica e/ou PCR onde parasitas não são visualizados</li> <li>• Não revela o estado imunológico</li> <li>• Necessita expertise</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GOMES <i>et al.</i>, 2008</li> <li>• MAIA; CAMPINO <i>et al.</i>, 2008</li> <li>• PALTRINIERI <i>et al.</i>, 2010</li> <li>• GRAMICCIA <i>et al.</i>, 2011</li> <li>• SOLANO-GALLENO <i>et al.</i>, 2011</li> </ul>

**TABELA 5 - VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA A DETECÇÃO DE *L. infantum* EM CÃES – continuação.**

<b>PCR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite detecção de DNA <i>Leishmania</i> I</li> <li>• Alta sensibilidade (kDNA) e especificidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possibilidade de resultados falso positivos devido a contaminação do DNA</li> <li>• Diferentes padronizações em diferentes laboratórios</li> <li>• Não revela o estado imunológico</li> <li>• Não pode ser apresentada como uma única técnica de diagnóstico para a confirmação da doença, pois o resultado positivo confirma a infecção por <i>Leishmania</i>, mas não a doença</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IKEDA; FEITOSA, 2006</li> <li>• SOLANO-GALLENO <i>et al.</i>, 2011</li> <li>• MOHAMMADIHA <i>et al.</i>, 2013</li> </ul>
<b>Parasitologia / Cultura</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite o isolamento do parasita de <i>Leishmania</i></li> <li>• Facilita a identificação isoenzimática do parasita</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica de diagnóstico laboriosa</li> <li>• Pode levar um mês para expressar o resultado</li> <li>• Aplicação apenas em pesquisas laboratoriais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SRIVASTAVA <i>et al.</i>, 2011</li> <li>• MONTALVO <i>et al.</i>, 2012</li> </ul>

A tabela 6 apresenta estudos da ocorrência de LV canina com distribuição geográfica nos diferentes continentes do mundo e nas diferentes regiões do Brasil, mostrando a prevalência encontrada pelas principais técnicas utilizadas nos últimos anos e alguns dados de sensibilidade e especificidade correspondentes a cada pesquisa realizada.

**TABELA 6 - ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE LV CANINA COM DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, AUTORES, PREVALÊNCIA, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO NO BRASIL E NO MUNDO.**

CONTINEN.	PAIS, CIDADE	TÉCNICA	PREVAL.	SENSIB./ ESPECIF.	AUTOR, ANO.
VELHO MUNDO					
	Portugal, Nordeste	ELISA DAT	33,2% 20,9%		SOUSA <i>et al.</i> , 2011
Europa	Espanha, Catalonia	RIFI ELISA Western Blot Imunocromatografia	20% 29,7% 37,9% 22,1%		BALLART <i>et al.</i> , 2013
Ásia	Palestina, West Bank	ELISA PCR Cultura	7,5% 11,5% 1,5%		HAMARSHEH <i>et al.</i> , 2012
	Irã, Ardabil	DAT	50,4%		BARATI <i>et al.</i> , 2013

**TABELA 6 - ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE LV CANINA COM DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, AUTORES, PREVALÊNCIA, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO NO BRASIL E NO MUNDO – continuação.**

NOVO MUNDO					
América do Sul	Argentina, Posadas	Imunocromatografia	38,5%	CRUZ <i>et al.</i> , 2010	
		RIFI	39,2%		
		PCR	47,3%		
Brasil					
Região Nordeste	Brasil, Bahia	ELISA	6,7%	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2010	
	Brasil, Bahia	RIFI	3,2%		
		ELISA	14,8%	SILVA <i>et al.</i> , 2010	
	Brasil, Fortaleza	Parasitologia	7,9%	SCHUBACH, 2011	
Região Norte	Brasil, Pernambuco	RIFI	29,3%	DANTAS-TORRES <i>et al.</i> , 2012	
		RIFI	67%	BARBOSA <i>et al.</i> , 2010	
		RIFI	47,8%	FELIPE <i>et al.</i> , 2011	
Região Sudeste	Brasil, Rio de Janeiro	PCR	59,3%	BIGELI; OLIVEIRA JUNIOR; TELES, 2012	
		ELISA	10,7%	FIGUEIREDO <i>et al.</i> , 2009	
	Brasil, São Paulo	RIFI	10%		
		ELISA	45,2%	100 / 91,2%	LIMA <i>et al.</i> , 2010
Região Sudeste	Brasil, Rio de Janeiro	Imunocromatografia	41,3%	91,5 / 94,7%	
		RIFI	36,4%	100 / 65,5%	FIGUEIREDO <i>et al.</i> , 2010
	Brasil, Minas Gerais	ELISA	15,9%		
		PCR-RFLP	24,7%	COURA-VITAL <i>et al.</i> , 2011	
Região Sudeste	Brasil, Rio de Janeiro	ELISA	17%	100 / 92%	SILVA <i>et al.</i> , 2013
		RIFI	10%	60 / 96%	
		DPP	17%	93 / 92%	
Brasil, Minas Gerais	ELISA + RIFI	10,6%	BORGES <i>et al.</i> , 2014		

**TABELA 6 - ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE LV CANINA COM DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, AUTORES, PREVALÊNCIA, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO NO BRASIL E NO MUNDO – continuação.**

	Brasil, Minas Gerais	Imunocromatografia	3,8%	CASTRO-JUNIOR <i>et al.</i> , 2014
	Brasil, Goiás	RIFI	9,3%	AZEVEDO <i>et al.</i> , 2011
Região Centro-oeste	Brasil, Mato Grosso do Sul	ELISA	65,0%	CUNHA <i>et al.</i> , 2012
		RIFI	80,0%	
		PCR	47,5%	
	Brasil, Mato Grosso	RIFI	22,1%	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2012
	Brasil, Mato Grosso	PCR	14,6%	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2013
	Brasil, Santa Catarina	ELISA + RIFI	6,9%	CORRÊA <i>et al.</i> , 2011
	Brasil, Santa Catarina	ELISA + RIFI	5,3%	PACHECO <i>et al.</i> , 2013
Região Sul	Brasil, Santa Catarina	ELISA + RIFI	1,4%	STEINDEL <i>et al.</i> , 2013
	Brasil, Paraná	RIFI	3,1%	DIAS <i>et al.</i> , 2013
		Imunocromatografia	6,3%	
		ELISA	48,3%	
	Brasil, Rio Grande do Sul	Imunocromatografia	2,1%	TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2013

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a LV canina pode ser considerada como um grave problema de saúde pública, que está em franca expansão, o que representa um grande desafio para os profissionais da saúde.

A LV canina estava inicialmente associada a áreas rurais, mas em decorrência das diversas mudanças no ambiente, como o desmatamento das regiões peri-urbanas, a urbanização progressiva e desordenada e o processo intenso de migração, tem ocorrido uma maior distribuição da doença para além das áreas endêmicas, fazendo com que a patologia apresente, hoje, um novo modelo de distribuição eco-epidemiológico, tendo, atualmente, grande importância no contexto epidemiológico das principais áreas urbanas do Brasil e do mundo.

No entanto, o conhecimento científico desenvolvido até então sobre a temática não condiz com a sua real importância. Muitos desafios devem ser superados no controle da doença. São necessários mais estudos para a formulação de novas drogas, regimes terapêuticos e protocolos de manejo clínico, com ênfase ao desenvolvimento científico, tecnológico e em inovação em saúde. Entretanto, mais do que a produção científica em si, é necessário um compromisso social de todos para evitar que a LV canina se estabeleça definitivamente como um agravo irreparável no cotidiano brasileiro.

## REFERÊNCIAS

- ABRANTES, P.; SILVEIRA, H. Alterações climáticas na Europa: efeito nas doenças parasitárias humanas. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, Lisboa, v. 27, n. 2, p. 71-86, 2009.
- ALBUQUERQUE, A. L. *et al.* Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* na região metropolitana do Recife. **Clinica Veterinária**, v. 71, n. 1, p. 78-80, 2007.
- ALMEIDA, A. B. P. F. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, p. 321–324, 2013.
- ALMEIDA, A. B. P. F. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 4, p. 359-365, 2012.
- ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A. J.; SOUSA, V. R. F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1610-1615, 2010.
- ALMEIDA, M. A.; JESUS, E. E.; SOUSA-ATTA, M. L. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 3-4, p. 227-232, 2005.
- ALVAR, J. *et al.* The WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v. 7, n. 5, e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671, 2012.
- ALVES, C. F. *et al.* Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania chagasi)*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 349-359, 2009.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos; o caso da epidemia em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.
- ASSIS, J. *et al.* Estudo Comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2010.
- AZEVEDO, E. M. R. *et al.* Estudo da leishmaniose visceral canina no município de Goiânia, Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 2, p. 159-168, 2011.

BALLART, C. *et al.* First survey on canine leishmaniasis in a non classical area of the disease in Spain (Lleida, Catalonia) based on a veterinary questionnaire and a cross-sectional study. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 109, n. 1-2, p. 116– 127, 2013.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. **Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 14-15, 2008.

BANETH, G. Canine leishmaniasis. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 35., 2010, Geneva. **Proceedings...** Geneva: Switzerland, 2010.

BANETH, G. *et al.* Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

BARATA, R.A., *et al.* Aspectos da Ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 421-425, 2005.

BARATA, R.A., *et al.* Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in a Reemerging Focus of Intense Transmission in Minas Gerais State, Brazil. **BioMed Research International**, v. 2013, Article ID 405083, 6 pages, doi:10.1155/2013/405083, 2013.

BARATI, M. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence survey of asymptomatic dogs in an endemic area of northwestern Iran. **Journal of Parasitic Diseases Springer** (publicação online), p. 1-4, 2013.

BARBOSA, D. S. *et al.* Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 653-659, 2010.

BARRIO, A. *et al.* *Leishmania infantum* and Human Visceral Leishmaniasis, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 354-355, 2012.

BARROUIN-MELO, S.M. *et al.* Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Veterinary Journal**, v. 171, n. 2, p. 331-339, 2006.

BIGELI, J. G; OLIVEIRA JUNIOR, W. P.; TELES, N. M. M. Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 18-23, 2012.

BIO-MANGUINHOS. Instituto de Tecnologia de Imunodiagnósticos. TR DPP<sup>®</sup> Leishmaniose Visceral Canina. Teste Rápido qualitativo para detecção de anticorpos de cão para *Leishmania*. **Bio-Manguinhos**. Rio de Janeiro, 2011.

BISUGO, M. C. *et al.* Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 185-193, 2007.

BORGES, B. K. A. *et al.* Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1035-1043, 2009

BORGES, L. F. N. M. *et al.* Prevalência e distribuição espacial da leishmaniose visceral em cães do município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 2, p. 352-357, 2014.

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças: Leishmaniose Visceral. **Guia de Vigilância Epidemiológica: leishmaniose visceral**, Brasília. 6 ed., p. 457-501, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília. 6 ed., 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Nota de esclarecimento sobre as Vacinas Anti leishmaniose Visceral Canina registradas no MAPA**, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota técnica conjunta da Secretaria de vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul sobre a situação da Leishmaniose Visceral na fronteira do Estado do Rio Grande do Sul com a Argentina**. Brasília, 2010a.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília. 7 ed., 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Subcoordenação de Zoonoses Vetoriais e Raiva. **Nota Técnica nº 01/2011UVR/CGDT/DEVEP/SVS/MS**. Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde, 2011a. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt\\_48\\_2011\\_diagnostico\\_lvc\\_19\\_9\\_2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_48_2011_diagnostico_lvc_19_9_2011.pdf)>. Acesso: 25 jun. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Série A. Normas e Manuais Técnicos. Leishmaniose Visceral, Recomendações clínica para redução da letalidade**. Brasília, 2011b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federativas, 1990 a 2011**. 2012. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1561](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561)>. Acesso: 6 mai. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federativas**. 2014. Disponível em:

<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinanet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>. Acesso: 6 mai. 2014.

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

CABRERA, M. A. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CALVOPINA, M.; ARMIJOS, R. X; HASHIGUCHI, Y. Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 7, p. 663-672, 2004.

CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impact of leishmaniasis on public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 12, n. 4, p. 527-548, 2006.

CAMPOS-PONCE, M. *et al.* *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on *Leishmania* tropism in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. **Experimental Parasitology**, New York, v. 109, p. 209–219, 2005.

CÂNDIDO, T. C. *et al.* Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 3-4, p. 175–181, 2008.

CANESE, A. Leishmaniosis visceral canina en el área metropolitana de la “Gran Asunción”, Paraguay. **Medicina (B Aires)**, v. 60 (Supl III), p. 65, 2000.

CARDOSO, L. *et al.* Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 117, n. 1-2, p. 35-41, 2007.

CARDOSO, L., *et al.* Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). **Acta Tropica**, v. 91, p. 95-100, 2004.

CASTRO-JUNIOR, J. G. *et al.* Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais State, Brazil, based on immunochromatographic dual-path platform (DPP®) and PCR assays. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 56, n. 3, p. 225-229, 2014.

CERBINO-NETO, J.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. N. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 7, p. 1543-1551, 2009.

CESSE, E. A. P. *et al.* Organização do espaço urbano e expansão do Calazar. **Revista Brasileira de Saúde Materno e Infantil**, v. 1, n. 2, p. 167-176, 2001.

CHAPPUIS, F. *et al.* Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in rural Nepal. **Tropical Medicine and International Health**, v. 11, n. 1, p. 31-40, 2006.

CHAPPUIS, F. *et al.* Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigenbased dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, n. 3, p. 277-285, 2003.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CORRÊA, G. L. B. *et al.* **Inquérito canino censitário de leishmaniose visceral no município de Florianópolis, em 2010**. 2011. Disponível em: <[http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/PDF/16\\_11\\_2011\\_10.24.22.2871ae70a3883368f5fb35793a3b4b00.PDF](http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/PDF/16_11_2011_10.24.22.2871ae70a3883368f5fb35793a3b4b00.PDF)>. Acesso: 10 jun. 2014

CORTES, S. *et al.* Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 189, n. 2-4, p. 189-196, 2012.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n. 2, p. 232-242, 2011.

COSTA, R. T. *et al.* Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 6, p. 678-682, 2003.

COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças infecciosas e Parasitárias**. 1 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

COURA-VITAL, W. *et al.* Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, 2011.

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

COUSIÑO, B. Vigilancia y Control de la leishmaniasis en el Paraguay. Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas,

Panaftosa, Rio de Janeiro, Brazil. **Organización Panamericana de la Salud**, p. 34-36, 2006.

CRUZ, I. *et al.* A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina). **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 342, 2010.

CUNHA, R.C. *et al.* Laboratory diagnosis and clinical signs of canine visceral leishmaniasis in dogs examined at the center for zoonosis control in Campo Grande – MS, Brazil. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, n. 4, p. 17-26, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, v. 2, Supplement N. 1, 2009. doi: 10.1186/1756-3305-2-S1-S1. Acesso: 11 set. 2013.

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

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

DA SILVA, S. M. *et al.* First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 174, n. 1-2, p. 150-154, 2010.

DAVIES, C. R. *et al.* The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 4, p. 925–950, 2000.

DEBONI, S. C.; BARBOSA M.; RAMOS R. R. Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul. **Boletim Epidemiológico**, v. 13, n. 1, p. 1-3, 2011.

DEN BOER M. *et al.* Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1471-1477, 2011.

DENIAU, M. *et al.* The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 97, Supplement N. 1, p. 15-33, 2003.

DESCHUTTER, J. *et al.* **Leishmaniosis visceral humana (LVH) en Misiones (Argentina). Estudio descriptivo retrospectivo (2006-2009)**. XIX Congreso Latinoamericano de Parasitología, p. 233. 2009; Asunción, Paraguay Federación Latinoamericana de Parasitología-FLAP; 2009.

DIAS, R. C. F. *et al.* **Occurrence of anti-*Leishmania* spp. Antibodies in domiciled dogs from the city of Foz do Iguaçu, state of Paraná, Brazil.** In: Fifth World Congress on Leishmaniosis, pp. 826, 2013.

DISCH, J. *et al.* Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 4, p. 391-395, 2003.

DOURADO, Z. F. *et al.* Panorama historico laboratorial da leishmaniose visceral ate o surgimento dos testes imunocromatograficos (rk39). **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 3, p. 205-214, 2007.

DUXBURY, R. E.; SADUN, E. H. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 13, n. 4, p. 525-529, 1964.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.

FAYE, B. *et al.* Seroprevalence of *Leishmania infantum* in a rural area of Senegal: analysis of risk factors involved in transmission to humans. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 6, p. 333-340, 2011.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 1, p. 71-80, 2004.

FELIPE, I. M. A. *et al.* *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n.2, p. 207-211, 2011.

FERNANDEZ-COTRINA, J. *et al.* Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniosis by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 118-128, 2013.

FERNÁNDEZ, M. S. *et al.* *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. **Acta Tropica**, v. 114, n. 2, p. 81-87, 2010.

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

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: Proceedings of Second International Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution, **Intervet Internacional**, Salamanca, p. 21-24, 2002.

FIGUEIREDO, F. B. *et al.* Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 2, p. 141-145, 2009.

FIGUEIREDO, F. B. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo, v. 52, n. 4, p. 193-196, 2010.

FIGUEIREDO, F. B. *et al.* Leishmaniose Visceral Canina: Dois casos autóctones no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 1, p. 1026, 2012.

FISA, R. *et al.* Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. **Veterinary Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 87–97, 1999.

FRAGA, D. B. *et al.* Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 190, p. 591-594, 2012.

FRANCINO, O. *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.

FREITAS, J. C. *et al.* Alterações clínicas e laboratoriais em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 24-29, 2012.

FUNED. Fundação Ezequiel Dias. **Funed valida teste mais rápido para leishmaniose visceral canina**. FUNED, Minas Gerais, abr. 2010. Disponível em: <http://www.isaude.net/pt-BR/noticias/6636/geral/funed-valida-teste-mais-rapido-para-leishmaniose-visceral-canina.htm>. Acesso: 19 ago. 2014.

GOMES, R. B. *et al.* Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 101, n. 2, p. 127-133, 2007.

GOMES, Y. M. *et al.* Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 45-52, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

GOULD, I.T. *et al.* Leishmaniasis visceral en la Argentina: notificación y situación vectorial (2006-2012). **Medicina (B Aires)**, v. 73, n. 2, p. 104-110, 2013.

GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Leishmaniasis. In: OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccine. **Office International des Epizooties**, 4 ed., Paris, p. 803–812, 2000.

GRADONI, L. **The diagnosis of canine Leishmaniasis**. In: Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the 2nd International Canine

Leishmaniasis Forum. Intervet International, Boxmeer, The Netherlands, p. 7-14, 2002.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 181, n. 1, p. 23-30, 2011.

GRIMALDI, G. JR. *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 of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54-59, 2012.

HAMARSHEH, O. *et al.* Serological and molecular survey of *Leishmania* parasites in apparently healthy dogs in the West Bank, Palestine. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 183, 2012.

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

IKEDA, F. G.; FEITOSA, M. M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, v. 11, n. 1, p. 32-38, 2006.

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

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

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

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

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

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

LEMOES, E. M. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect™) in dogs with and without signs of the disease. **Acta Tropica**, v. 107, n. 1, p. 205–207, 2008.

LIMA-JÚNIOR, F. E. F. **Fatores preditivos para leishmaniose visceral canina em quatro municípios endêmicos do Brasil**. 2012. 51 p. Dissertação (Mestrado em

Modalidade Profissional em Epidemiologia em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2012.

LIMA, V. M. F. *et al.* Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 3-4, p. 330–333, 2010.

LINHARES, G. F. C. *et al.* Relato de um caso clínico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 1, p. 69-72, 2005.

LIRA, R. A. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**: avaliação do desempenho dos kits EIE Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI Leishmaniose-Visceral- Canina-Bio-Manguinhos. 2005. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Saúde Coletiva, Recife, 2005.

LOPES, M. G. *et al.* Presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* in dogs from Piauí. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 111-114, 2011.

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

MADEIRA, M. F. *et al.* Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases**: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases, v. 8, n. 6, p. 440-444, 2004.

MADEIRA, M. F., *et al.* Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target? **Research in Veterinary Science**, London, v. 87, n. 2, p. 260-262, 2009.

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

MAIA, C. *et al.* Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 142-144, 2009.

MANCIANTI, F. *et al.* Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 566–567, 1988.

MANNA, L. *et al.* Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimonite and allopurinol. **Veterinary Journal**, v. 177, n. 2, p. 279– 282, 2007.

MARTY, P. *et al.* Leishmaniasis in France: an update. **Archives de Pediatrie**, v. 16, Supplement 2, p. 96-100, 2009.

MARY, C. *et al.* Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5249–5255, 2004.

METTLER, M. *et al.* Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and get tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dog. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.

MIRÓ, G. *et al.* Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 371-377, 2008.

MOHAMMADIHA, A. *et al.* Canine visceral leishmaniosis: A comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 83-90, 2013.

MONTALVO, A. M. *et al.* Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Habana, v. 64, n. 2, 2012.

MOREIRA, M. A. B. *et al.* Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v.145, n. 3-4, p. 245-252, 2007.

MORENO, E. C. *et al.* Fatores de risco para infecção por *Leishmania chagasi* em uma área urbana do Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 456-463, 2005.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitology**, v.18, n. 9, p. 399-405, 2002.

OLIVEIRA, G. M. Técnicas Diagnósticas Utilizadas na Rotina de Serviços de Saúde no Brasil. In: Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis visceral em las Américas. **Organización Panamericana de la Salud**, Rio de Janeiro, p. 66-68, 2005.

OLIVEIRA, L. C. P. *et al.* Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Ávila, State of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 400-404, 2010.

PACHECO, A.D. *et al.* *Leishmania* sp. infection in dogs from Florianopolis, Santa Catarina, SC, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 50, n. 3, p. 220-225, 2013.

- PAIVA-CAVALCANTI, M.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; GOMES, Y. M. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 4, p. 537-542, 2010.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DAY, M. J. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasit Vectors**, v. 4, n. 197, 2011.
- PALTRINIERI, S. *et al.* Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.
- PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 14, n. 12, p. 1032-1039, 2010.
- PEREIRA, E. *et al.* Molecular diagnosis of leishmaniosis in the Parana state of southern Brazil. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1200-1212, 2008.
- QUEIROZ-JÚNIOR, E. M. **Validação do teste imunocromatográfico rápido Dual Path Platform para o diagnóstico da leishmaníase visceral canina**. 2011. 77 p. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2011.
- QUINNELL, R. J. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v. 122 (Pt.3), p. 253-261, 2001.
- QUINNELL, R. J. *et al.* IgG subclasses responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 91, n. 3-4, p. 161-168, 2003.
- REIS, A. B. *et al.* Parasite density and impaired biochemical/ hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.
- REIS, A. B. *et al.* Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009.
- REIS, M. M. **Testes imunológicos**: manual ilustrado para profissionais da saúde. Porto Alegre: Senac, 1999.
- REITHINGER, R. *et al.* Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2352–2356, 2002.
- SALOMON, O. D. *et al.* First visceral leishmaniasis focus in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 109-111, 2008.

SALOMON, O. D. *et al.* Visceral leishmaniasis in border areas: clustered distribution of phlebotomine sand flies in Clorinda, Argentina. SALOMON, O. D. *et al.* First visceral leishmaniasis focus in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 5, p. 801-804, 2009.

SANTOS, D. R.; FERREIRA, A. C.; BISETTO-JUNIOR, A. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 643-645, 2012.

SASSAKI, C.Y. *et al.* Comparison of different diagnostic in dogs uninfected and naturally infected with visceral leishmaniasis. **The Journal of Venenous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. 348-352, 2011.

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) – Universidade de Brasília, 2011.

**SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL (SES/RS)**. Centro estadual de vigilância em saúde, Divisão de Vigilância Ambiental em Saúde, Núcleo de Vigilância dos Riscos e Agravos Ambientais Biológicos, 2009. Situação de leishmaniose visceral no RS. Disponível em: [www.saude.rs.gov.br/dados/1239825393188SITUA%C7%C3O%20NO%20RS.pdf](http://www.saude.rs.gov.br/dados/1239825393188SITUA%C7%C3O%20NO%20RS.pdf). Acesso: 02 mai 2014.

SILVA, D. A. *et al.* Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 1-3, p. 257-261, 2011.

SILVA, D. A. *et al.* Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **The Veterinary Journal**, v. 195, n. 2, p. 252–253, 2013.

SILVA, E. A. *et al.* Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Experimental Parasitology**, New York, v. 119, n. 3, p. 343-348, 2008.

SILVA, F. T. S. *et al.* Aspectos clínicos da Leishmaniose Visceral canina no Distrito de Monte Gordo, Camaçari (BA). **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 34, n. 4, p. 783-795, 2010.

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

SOBRINO, R. *et al.* Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 3-4, p.198-203, 2008.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560–563, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 4, p. 676-680, 2007.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 1–18, 2009.

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

SOUSA, S. *et al.* Seroepidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. **Acta Tropica**, v. 120, n. 1–2, p. 82–87, 2011.

STEINDEL, M. *et al.* Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 490-496, 2013.

SUNDAR, S. *et al.* Implementation research to support the initiative on the elimination of kala azar from Bangladesh, India and Nepal – the challenges for diagnosis and treatment. **Tropical Medicine & International Health**, v. 13, n. 1, p. 2-5, 2008.

SZARGIKI, R. *et al.* Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47-52, 2009.

TARTAROTTI, A. L. *et al.* **Boletim Epidemiológico. Equipe de Vigilância das Doenças Transmissíveis.** Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre, v. 13, p.5-6, 2011.

TASCA, K. I. *et al.* Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 27-33, 2009.

TAVARES, N. M. *et al.* Estratégias de vacinação contra Leishmaniose Visceral e Cutânea: Lições dos modelos experimentais. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79 (Supl. 3), n. 143, p. 110-121, 2009.

TEIXEIRA, M. C. *et al.* **Occurrence of seropositivity for *Leishmania infantum chagasi* in dogs from built-up areas of the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul-Brazil.** In: fifth World Congress on Leishmaniosis, pp. 854, 2013.

THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 46-51, 2009.

WELCH, R. J.; ANDERSON, B. L.; LITWIN, C. M. Rapid Immunochromatographic Strip Test for Detection of Anti-K39 Immunoglobulin G Antibodies for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 9, p. 1483-1484, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report**. Geneva, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**, Geneva, p. 22-26, 2010.

## CAPÍTULO II - FOCO RURAL-URBANO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO EXTREMO-OESTE DO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência de leishmaniose visceral em cães da região extremo-oeste de Santa Catarina, como sinalizadores da possível presença do ciclo do parasito. Avaliação clínica, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram utilizados para a investigação epidemiológica. Dentre os 252 cães estudados, 43 foram positivos por RIFI, 50 por ELISA e 55 foram por PCR. Do total, 48 animais foram positivos por dois métodos (sorológico e molecular), destes 19 (39,6%) apresentaram sinais clínicos compatíveis com leishmaniose visceral, 35 (72,9%) eram de área rural e 13 (27,1%) de área urbana. A análise dos dados revelou que o diagnóstico positivo foi estatisticamente associado com sintomatologia, raça e idade ( $p \leq 0,05$ ). O índice Kappa apresentou correlação muito boa entre ELISA e RIFI (0,618), ELISA e PCR (0,627) e excelente entre RIFI e PCR (0,849). Este estudo preliminar confirma a presença de *L. infantum* nos municípios de São Miguel do Oeste e Descanso na região do extremo-oeste de Santa Catarina, indicando a ocorrência de casos autóctones, mostrando a possibilidade não apenas de foco de LV canina como também para o aparecimento de casos humanos no futuro. As características do ciclo epidemiológico da LV nesta região devem ser determinadas. Um estudo filogenético oferecerá importantes informações sobre como o parasito chegou nessa região de fronteira com a Argentina ou os estados do Paraná e Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*. Cães. Diagnóstico. Sorologia. PCR

## RURAL-URBAN FOCUS OF CANINE VISCERAL LEISHMANIOSIS IN THE FAR WESTERN REGION OF SANTA CATARINA STATE, BRAZIL

### ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the occurrence of visceral leishmaniasis in dogs in the far western region of Santa Catarina State, as indicators of the possible presence of the parasite cycle. Clinic examination, Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT), Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Polymerase Chain Reaction (PCR) were used for epidemiological investigation. Among the 252 dogs surveyed, 43 were positive by IFAT, 50 by ELISA assay and 55 were positive by PCR. From the 48 positive dogs for VL by both serological and molecular methods, 19 (39.6%) presented clinical symptoms of leishmaniasis, 35 (72.9%) were from rural areas and 13 (27.1%) from urban areas. Data analysis revealed that positive diagnosis was statistically associated with symptomatology, breed and age ( $p \leq 0.05$ ). Kappa statistic showed very good correlation between ELISA and IFAT (0.618), ELISA and PCR (0.627) and excellent between IFAT and PCR (0.849). This preliminary study confirms that the presence of *L. infantum* in the municipalities of São Miguel do Oeste and Descanso in the western region of Santa Catarina State means the occurrence of an outbreak is possible, as is the appearance of human cases in the future. The characteristics of the epidemiological cycle of VL in this region remain to be determined. A phylogeny study will provide important information regarding whether the parasite arrived in this region from neighboring Argentina or the States of Parana or Rio Grande do Sul.

Keywords: *Leishmania infantum*. Dogs. Diagnosis. Serology. PCR.

## 1 INTRODUÇÃO

Leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica causada por *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908 e que na ausência de tratamento resulta em casos fatais. É uma zoonose que tem como reservatório o cão doméstico (DANTAS-TORRES, 2006; CORTES *et al.*, 2012).

Inúmeros estudos epidemiológicos têm mostrado o rápido crescimento da doença no mundo e no Brasil (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; MORENO; ALVAR, 2002; ALVAR *et al.*, 2004; MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; MARCONDES; ROSSI, 2013). No Brasil, as migrações humanas e de animais, a pobreza na região periférica de grandes centros, a construção de usinas hidroelétricas e gasodutos, vêm alterando o padrão de distribuição geográfica da LV humana e canina. Dados revelam que no período de 1980 a 2005 foram registrados 59.129 casos no país, sendo 83% na região Nordeste. No entanto, gradativamente o parasito chegou a outras regiões, especialmente Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; MARCONDES; ROSSI, 2013). Os fatores de risco para LV no Brasil podem variar de uma área a outra dependendo do perfil de cada região. A ocorrência de epidemia de LV em área urbana de grandes cidades brasileiras, como São Luís (MA), Teresina (PI), Fortaleza (CE), Aracaju (SE), Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG) e Araçatuba (SP), demonstrou a mudança do perfil epidemiológico da doença, como influência do processo migratório do campo para as grandes cidades. Em outras regiões, como Santarém (PA), Russas (CE), Jacobina (BA), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (MS) o calazar atinge bairros de periferia que guardam certas características rurais (MARCONDES; ROSSI, 2013).

Mais recentemente, foi registrada a ocorrência de LV na região Sul do Brasil (TARTAROTTI *et al.*, 2011; FIGUEIREDO *et al.*, 2012; STEINDEL *et al.*, 2013; DIAS *et al.* 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2013). Países vizinhos da região Sul do Brasil, como Paraguai e Argentina, já vêm assinalando o agente patogênico em cães e humanos além de registrar o vetor *Lu. longipalpis* (CANESE *et al.*, 2000; SALOMON *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2010; ALVAR *et al.*, 2012; BARRIO *et al.*, 2012; SANTINI *et al.*, 2012; BRAVO, *et al.*, 2013; GOULD *et al.*, 2013). O alerta sobre LV na região Sul do Brasil se faz necessário. Além de práticas comuns entre países de fronteira, a atividade de caça com cães no país argentino é um exercício comum na região extremo-oeste de Santa Catarina. Estes são fatores que poderiam desencadear um

surto da doença, uma vez que a Argentina e Paraguai têm registrado muitos focos de LV próximo à divisa (CANESE, 2000; COUSIÑO, 2006; SALOMON *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2010; BRAVO *et al.*, 2013).

Neste contexto é importante realizar pesquisa de *L. infantum* em cães como sinalizadores assim como a vigilância dos casos de LV, uma vez que a presença dessa doença nos animais, geralmente, tem precedido a ocorrência de casos humanos (MARZOCHI *et al.*, 2009).

Resumindo, considerando que a investigação de *L. infantum* deve se basear em um diagnóstico confiável e que os protocolos empregados para diagnóstico de LV canina apresentem eficácia desejada foi utilizada a combinação de diagnóstico sorológico e molecular, no intuito de encontrar o maior número de animais verdadeiramente positivos. A partir deste dado primário, será necessário seguir com pesquisa da presença do vetor, estudo filogenético e desenvolvimento de programas de vigilância e controle da infecção na região estudada.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a soroprevalência e detecção de DNA de *L. infantum* em cães da região extremo-oeste de Santa Catarina, como sinalizadores da possível presença do parasito e a participação desses animais na manutenção do ciclo do parasito.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* na população amostrada por técnica de Ensaio Imunoenzimático - ELISA;
- Investigar a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* em cães daquela região, utilizando a Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI;
- Determinar a prevalência da infecção na população canina amostrada por Reação em Cadeia da Polimerase - PCR;
- Comparar qualitativa e quantitativamente os métodos empregados no diagnóstico de LV canina.
- Relacionar as variáveis: sexo, raça, faixa etária e classificação clínica associadas à prevalência para *L. infantum*.
- Avaliar os sinais clínicos observados nos cães positivos para LV.

### 3 JUSTIFICATIVA

Leishmaniose visceral (LV) é considerada uma das seis doenças endêmicas de maior importância no mundo. Possui ampla distribuição e registro de casos em todos os continentes, à exceção da Oceania (BRASIL, 2010b). A doença atinge as cinco regiões brasileiras sendo que os casos estão mais concentrados na região Nordeste, seguida pelas regiões Norte, Sudeste, Centro-Oeste e Sul (BRASIL, 2014).

Vários estudos epidemiológicos destacam o cão como principal reservatório de *L. infantum* e é fundamental avaliar a prevalência da LV canina em áreas endêmicas e não endêmicas, uma vez que é crescente a disseminação e difusão da doença (FREHSE *et al.*, 2010). Um exemplo disso pôde ser observado na região Sul do Brasil, considerada área indene, passa a ter casos autóctones de LV canina nas cidades de São Borja no Rio Grande do Sul (TARTAROTTI *et al.*, 2011, TEIXEIRA *et al.* 2013), Foz do Iguaçu no Paraná (fronteira com a Argentina e Paraguai) e Florianópolis, capital de Santa Catarina que assinalaram recentemente casos autóctones de LV canina, além da comprovação da presença do vetor *Lu. Longipalpis*, nestas regiões (FIGUEIREDO *et al.*, 2012; SANTOS; FERREIRA; BISETTO-JUNIOR, 2012; DIAS *et al.*, 2013; STEINDEL *et al.*, 2013).

A região do extremo-oeste de Santa Catarina localiza-se em um ambiente rural, com grandes extensões de matas e presença de animais silvestres. Faz fronteira com países e estados que apresentam casos de LV canina, como o Rio Grande do Sul, Paraná, Paraguai e Argentina.

Em função disso questiona-se:

- Haveria *L. infantum* nos cães da região extremo-oeste do estado de Santa Catarina?
- Os métodos de diagnóstico empregados determinaram a real prevalência de *L. infantum*, com índices de sensibilidade e especificidade das técnicas empregadas verdadeiros?
- Os animais, se positivos, apresentariam sinais clínicos compatíveis com as características do desenvolvimento da doença nos cães?
- As diferentes variáveis como sexo, idade, sinais clínicos e habitat seriam significativas para a ocorrência ou não de LV nesses cães?

Considerando-se a ocorrência de casos de LV na região Sul do Brasil, a relevância da doença, a possibilidade de identificação e vigilância dos possíveis cães afetados e a falta de dados epidemiológicos referentes à LV na região extremo-oeste de Santa Catarina, o presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de LV em cães da região, como sinalizadores da possível presença do parasito. E para atingir os objetivos foi realizado levantamento sorológico (ELISA e RIFI) e pesquisa de DNA do parasito por técnica molecular (PCR).

#### 4 HIPÓTESES

1. Os cães que vivem em área rural, na presença de outros animais, na proximidade das matas (proximidade ao vetor), da raça veadeiro, são mais susceptíveis à infecção por *Leishmania infantum*.
2. Os animais positivos apresentam sinais e sintomas compatíveis com LV.
3. O diagnóstico de LV canina deve apresentar boa sensibilidade e especificidade, portanto, as técnicas “*in house*” são confiáveis e detectam o número real de cães parasitados.
4. A ocorrência de *L. infantum* em cães da região é esperada pela proximidade com áreas de transmissão e pela presença de cães com sinais e sintomas compatíveis com LV.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi conduzido nos municípios de São Miguel do Oeste e de Descanso, latitude aproximada de 26° 43' 31" e longitude de 53° 31' 05". Os municípios estão localizados muito próximos às fronteiras do Paraná, Rio Grande do Sul e Argentina. O clima é subtropical úmido, a temperatura média anual é de 18 - 20 °C e a média anual de precipitações variam de 2000 mm a 2400 mm (PLANO DIRETOR MUNICIPAL, 2009) (Figura 1).



**Figura 1** - Localização geográfica da área de estudo para ocorrência de leishmaniose visceral na região extremo-oeste do estado de Santa Catarina, Sul do Brasil (em vermelho). Fonte: Adaptado (Google Earth).

A região do extremo-oeste do estado de Santa Catarina tem sua vegetação predominante constituída por mata caducifolia, cujos remanescentes são observados no vale do Rio das Antas, integradas às atividades agrícolas e vegetações secundárias e floresta ombrófila mista (mata de araucária). Considerando a geomorfologia, destacam-se altitudes máximas de 600 a 680 metros nos arredores do rio das Antas e no extremo-leste do município e mínimas de 280 metros (PLANO DIRETOR MUNICIPAL, 2009).

Atualmente, a agropecuária e atividades afins são as principais características da economia de São Miguel do Oeste e Descanso, o que não é diferente dos demais municípios da região. A soja, o milho, a mandioca e o fumo são os principais produtos produzidos nos municípios. Já o efetivo de rebanho mais significativo é o de galináceos, seguido do rebanho de suínos e bovinos. Outros produtos de origem animal também fazem parte da produção rural, como leite, mel e ovos. Embora ainda com pouca expressividade, pode-se dizer que a região produz uma gama de produtos que pode caracterizar uma diversificação na produção agrícola. Outro aspecto observado é que embora a produção de bovinos não seja a mais importante na economia municipal, a área destinada a pastagens é muito superior à destinada às matas e florestas, só ficando atrás da área destinada às lavouras (PLANO DIRETOR MUNICIPAL, 2009).

## 5.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Positivo (UP) pelo protocolo número 112/2012. As coletas foram realizadas respeitando-se os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado pelos proprietários dos animais (Anexo 1).

## 5.3 POPULAÇÃO CANINA ESTUDADA

Amostras de sangue de 252 cães foram coletadas por punção da veia braquial ou jugular, o soro foi separado e estocado a -20 °C até seu emprego em exame sorológico. O sangue para realização da técnica de PCR foi coletado em tubo com EDTA e após centrifugação foi separada a camada leucocitária para extração de DNA a ser usado para a técnica de PCR.

Um registro de dados dos animais foi feito com: nome, raça, sexo, idade, local de origem, antecedentes clínicos e presença de sinais clínicos compatíveis com LV. Ainda, continha informações da propriedade quanto à presença de matas, presença de outros animais, matéria orgânica, depósitos de água, esgoto e lixo próximos às moradias (Apêndice 2). Foram eliminados da amostragem cães com menos de seis

meses, fêmeas prenhas e aqueles cujos proprietários não autorizaram a coleta de sangue.

Os cães pesquisados para LV foram amostrados de forma aleatória em áreas rural e urbana.

#### 5.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os cães foram avaliados clinicamente por médico veterinário adotando-se a classificação de Abranches *et al.* (1991) modificada por Molina *et al.* (1994).

Foram observadas e avaliadas as características típicas de cães com LV, dentre elas, alterações de pele, linfadenopatia, emagrecimento, onicogrifose e anorexia.

#### 5.5 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL PARA ELISA

Para obtenção do antígeno, promastigotas de cepas referência de *Leishmania infantum* (MHOM/FR/71/LRM75), foram cultivadas em meio de crescimento bifásico NNN (Novy-McNeal-Nicolle) e mantidas a 24°C e repicadas a cada sete dias. Após multiplicação as formas promastigotas foram recolhidas da fase exponencial de crescimento e lavadas com salina esterilizada (0,9% e 0,3%) e PBS pH 7,2 e recuperadas por centrifugação a 4°C. Em seguida foram suspensas até obter concentração de  $10^7$  promastigotas/mL para produção de antígenos para o teste ELISA. A produção de antígeno para o teste ELISA foi realizada conforme descrito por Castro, Thomaz-Soccol, Augur (2003) e Szargiki *et al.* (2009) (Anexo 3).

#### 5.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Conforme Castro, Thomaz-Soccol, Augur (2003) e Szargiki *et al.* (2009), as amostras de soros de cães foram analisadas em microplacas de 96-poços de alta adesão, sensibilizadas com 500 ng/ $\mu$ L de proteína em 100  $\mu$ L tampão carbonato bicarbonato 0,05M, pH 9,6 por poço e mantidas *overnight* a 4°C. Após a reação, a placa foi bloqueada com solução de caseína 2% em PBS. Os soros foram diluídos 1:100 e adicionados em cada poço e incubados a 37°C por 1h. As placas foram lavadas quatro vezes e incubadas com conjugado-peroxidase imunoglobulina G anti-

ção (Sigma) diluído a 1: 2500. A reação foi revelada usando peróxido de hidrogênio e orto-fenileno diamino e interrompida com 20 µL de ácido sulfúrico a 2% por poço. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 492 nm (Anexo 7).

### 5.6.1 Avaliação do ponto de corte (“cut-off”)

Após a padronização final do teste de ELISA, a partir das absorbâncias obtidas, uma abordagem foi adotada para a determinação do ponto de corte (“cut-off”) e definição dos soros positivos e negativos. Amostras positivas (n=40) e negativas (n=40) de cães da cidade de Foz do Iguaçu (PR) foram usadas para estabelecimento do ponto de corte, ficando determinado em 0,210.

Após a classificação de cada soro como sendo positivo ou negativo foi possível estimar índices de qualidade como sensibilidade e especificidade. O ponto de corte para otimização da sensibilidade e especificidade do teste ELISA foi determinado usando a análise Receiver Operating Characteristic (ROC) (METZ, 1978; ZWEING; CAMPBELL, 1993). A curva ROC é uma ferramenta estatística avançada para avaliação e comparação dos resultados de testes diagnósticos. Este programa possibilita a avaliação da acurácia global através da Área sob a Curva ROC (Area Under Curve - AUC) e o estudo da sensibilidade e especificidade com vários pontos de corte. Os dados geram uma tabela onde cada ponto de corte impacta na sensibilidade e especificidade. As informações geradas subsidiam a identificação do ponto de corte ideal.

Os cálculos dos valores preditivos positivos e negativos foram realizados considerando-se a estimativa de prevalência da doença na população de indivíduos com suspeita da doença (19,8%).

A análise estatística foi realizada usando o Software Estatístico MedCalc (versão 13.2.0). O intervalo de confiança (IC) foi de 95% e áreas acima da curva (AUCs) foram comparadas. A sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos do ELISA e seus respectivos IC de 95% foram determinados.

## 5.7 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO PARA RIFI

O preparo dos antígenos seguiu os protocolos conforme Castro (2001), com adaptações (Anexo 4). As formas promastigotas aqui usadas foram de *L. infantum*

obtida após cultivo em meio CCS. Depois da recuperação das formas promastigotas, por centrifugação, as mesmas foram reconstituídas com PBS pH 7,2 submetidas a temperatura de 55°C por oito minutos, em banho-maria para desfazer rosetas de promastigotas existentes. Procedeu-se em seguida a contagem das formas promastigotas, para o cálculo da diluição final do produto. Uma vez estabelecida a diluição ótima do antígeno, o mesmo foi dividido em alíquotas e armazenado a 4°C.

## 5.8 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

Conforme Castro (2001), para RIFI, a padronização da técnica foi alcançada com progressivas diluições de soros positivos e negativos usados como controles (1:20 a 1:320) contra progressivas diluições do conjugado (1:50 a 1:200), em 5 lâminas. Os soros amostrados foram testados em diluição de 1:40. O conjugado IgG (isotiocianato de fluoresceína – Sigma) foi usado na diluição de 1:150 em solução de PBSAE (PBS – Azul de Evans) 0,004% para uma triagem prévia.

Todos os testes foram realizados em duplicata, sendo que a cada série de amostras controles negativos e positivos foram adicionados nas lâminas, observando a ocorrência de algum tipo de não-conformidade ou contaminação. As amostras foram mantidas sob abrigo de luz e umidade até a leitura, evitando degradação. As lâminas foram lidas usando microscópio para imunofluorescência (lâmpada HBO 200 e filtro BG 12) no aumento de 400X (Anexo 5).

## 5.9 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O DNA foi extraído da camada leucocitária do sangue dos cães usando a tradicional técnica de fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) (Anexo 8). Após a precipitação com etanol, o DNA foi ressuspendido em 50 µL de água ultra-pura e incubado com RNase A (10 mg/mL) a 37°C por uma hora e estocado a -20°C. Para amplificar os 145 pares de base da região conservada do fragmento de DNA de *L. infantum*, os primers RV1F (5'- CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3') e RV2R (5'- CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3') foram usados (LACHAUD *et al.*, 2002). A PCR foi realizada em volume final de 25 µL contendo 5 µL of DNA, 1x buffer, 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,16 pmol de cada primer (F e R), 2 U Taq polimerase e água para completar o volume final. As condições da reação estão descritas na Tabela 1.

**TABELA 1 - AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE *L. infantum* PARA OS INICIADORES RV1F E RV2R.**

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturação inicial	94 °C	5 min.	1
Desnaturação	94 °C	30 s.	35
Hibridação	59 °C	30 s.	35
Extensão	72 °C	30 s.	35
Extensão final	72 °C	10 min.	1

Após amplificação 5 µL de produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, visualizado por UV e fotografado (Anexo 9).

DNA de cultura de *L. infantum* foi usado como controle positivo em cada amplificação e eletroforese. E DNA de cão não infectado, bem como a não adição de DNA, foram usados como controles negativos da técnica. Todos os procedimentos de extração de DNA foram realizados em ambientes separados para evitar possível contaminação.

### 5.10 ÍNDICE KAPPA

Os cálculos do índice Kappa, para avaliação da concordância entre os resultados obtidos nos testes de ELISA, RIFI e PCR, foi realizado pelo Software Estatístico MedCalc (versão 13.2.0). A interpretação do índice foi realizada segundo Pereira (1995) (Tabela 2).

**TABELA 2 - INTERPRETAÇÃO DOS VALORES DO ÍNDICE KAPPA.**

<b>Valor de Kappa</b>	<b>Correlação</b>
< 0,00	Ausente
0,00 a 0,20	Ruim
0,21 a 0,40	Fraca
0,41 a 0,60	Regular
0,61 a 0,80	Boa
0,81 a 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Fonte: PEREIRA (1995)

## 5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O percentual de LV canina foi calculado de acordo com a fórmula:  $n^\circ$  de cães positivos dividido pela população amostrada vezes cem. O teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) foi usado para comparar a prevalência dos resultados obtidos de sexo, idade, raça, sinais clínicos e local de origem. O índice Kappa foi usado para verificar a concordância entre os métodos de diagnóstico (dar referência). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ .

Para o cálculo que atesta a validade dos resultados obtidos por sorologia, o diagnóstico de positividade foi estabelecido por comparação face a um teste considerado como de referência para a doença. No caso da LV canina optou-se pelo teste de RIFI porque vem sendo utilizado há muito tempo, com bons resultados.

Na tabela 3, são mostrados os cálculos para estabelecer os percentuais de sensibilidade, especificidade, valor de predição positivo (VPP), valor de predição negativo (VPN) entre as técnicas, usando como referência o teste de RIFI.

**TABELA 3 - ÍNDICES PARA AFERIÇÃO DOS RESULTADOS DO TESTE DE ELISA/PCR COMPARANDO COM O TESTE DE REFERÊNCIA DE RIFI.**

ELISA/PCR	RIFI (referência)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	A	B	A+B
Negativo	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D

Onde: Sensibilidade =  $A/(A+C)$

Especificidade =  $D/(B+D)$

Valor de predição positivo =  $A/(A+B)$

Valor de predição negativo =  $D/(C+D)$

Acurácia =  $A+D/(A+B+C+D)$

## 5.12 ALGORÍTIMO PARA CONSIDERAR UM ANIMAL POSITIVO

Para um animal ser considerado infectado ele terá que apresentar dois ou mais testes positivos (Tabela 4).

**TABELA 4 - ALGORITMO PARA CONSIDERAR UM ANIMAL POSITIVO**

TÉCNICA			DIAGNÓSTICO	AÇÃO
RIFI	ELISA	PCR		
P	P	P	Positivo	Notificar Secretaria Municipal de Saúde para medidas de controle
P	P	N	Positivo	
P	N	P	Positivo	
N	P	P	Positivo	
N	N	P	Negativo	Acompanhamento clínico para soroconversão ou detecção do DNA
N	P	N	Negativo	
P	N	N	Negativo	
N	N	N	Negativo	Descartar o caso

Fonte: o autor.

## 6 RESULTADOS

A maioria dos cães (74,7%) vive em área rural, com matas e florestas muito próximas às moradias. Também foi comum a presença de outros animais (gambás, roedores, cavalos e muares) e matéria orgânica na área peridomociliar, decorrente do acúmulo de folhas e frutos.

Oitenta e três por cento dos cães estudados não tinham raça definida, 59,5% eram machos, 74,5% com idade entre 2 a 6 anos, 86,5% eram nascidos naquela região e não estiveram em outros locais há pelo menos dois anos (Tabela 5).

Uma diferença estatisticamente significativa foi observada com relação ao maior número de cães positivos da raça veadeiro e idade de 7 a 10 anos ( $p \leq 0,05$ ). Isso indica que cães da raça veadeiro, conhecidos pela atividade de caça estão mais susceptíveis ao contato com o vetor, por viver ou habitar frequentemente matas e florestas. Cães positivos com idade mais avançada indicam mais tempo expostos ao risco de picada do vetor e à diminuição da imunidade, que por sua vez aumentam as chances de se infectar com o parasito.

**TABELA 5 – ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES E DA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA, BRASIL, 2012-2014.**

<b>Condições ambientais</b>	<b>Número (%) de residências</b>	<b>Número (%) de cães positivos</b>
<b>Local da residência</b>		
Área rural	56 (74,7)	35 (72,9)
Área urbana	19 (25,3)	13 (27,1)
<b>Presença de mata próximo da residência</b>		
Mata ciliar	05 (6,7)	01 (2,1)
Mata nativa	37 (49,3)	25 (52,1)
Reflorestamento	15 (20,0)	12 (25,0)
Reflorestamento + mata nativa	14 (18,7)	10 (20,8)
Sem florestas	04 (5,3)	00 (0,0)
<b>Presença de outros animais</b>		
Sim	71 (94,7)	48 (100,0)
Não	04 (5,3)	00 (0,0)
<b>Presença de matéria orgânica no quintal</b>		
Sim	73 (97,3)	48 (100,0)
Não	02 (2,7)	00 (0,0)

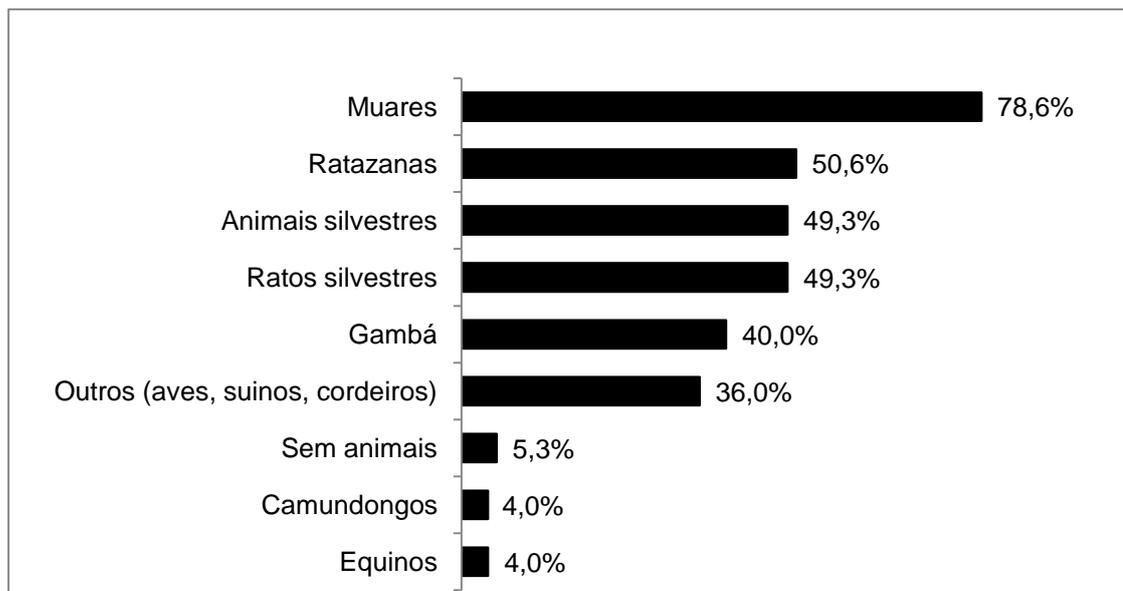
**TABELA 5 – ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES E DA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA, BRASIL, 2012-2014 – continuação.**

<b>Características dos cães</b>	<b>Número (%) total</b>	<b>Número (%) de cães positivos</b>
<b>Raça</b>		
Sem raça definida	208 (82,5)	35 (72,9)
Fila Brasileiro	17 (6,7)	00 (0,0)
Veadeiro	11 (4,4)	10 (20,8)*
Outras	16 (6,4)	03 (6,3)
<b>Idade</b>		
Até 1 ano	38 (15,1)	04 (8,3)
2 a 6 anos	188 (74,6)	23 (47,9)
7 a 10 anos	21 (8,3)	15 (31,3)*
Mais que 10 anos	05 (2,0)	06 (12,5)
<b>Sexo</b>		
Macho	150 (59,5)	27 (56,3)
Fêmea	102 (40,5)	21 (43,8)
<b>Cães caçadores</b>		
Sim	25 (9,9)	15 (31,2)
Não	234 (90,1)	32 (68,8)

\*p ≤0,05

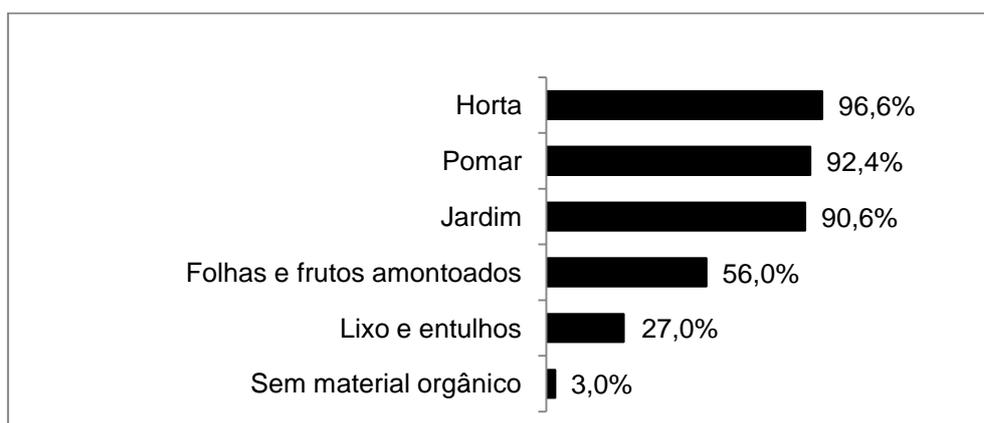
Dentre todos os proprietários entrevistados, nenhum relatou conhecer o vetor conhecido como mosquito palha ou birigui. Ainda, a presença do mosquito não foi constatada, sendo que o único tipo de controle contra insetos nas residências é o uso de repelentes elétricos usados somente durante a noite para dormir.

De acordo a análise das condições ambientais, foi possível observar que a grande maioria dos cães investigados (94,7%) vive ou convive com outros animais na propriedade, destacando-se os muares e roedores (Figura 2).



**Figura 2** - Presença de outros animais nas propriedades da região extremo-oeste de Santa Catarina, Brasil, 2012-2014.

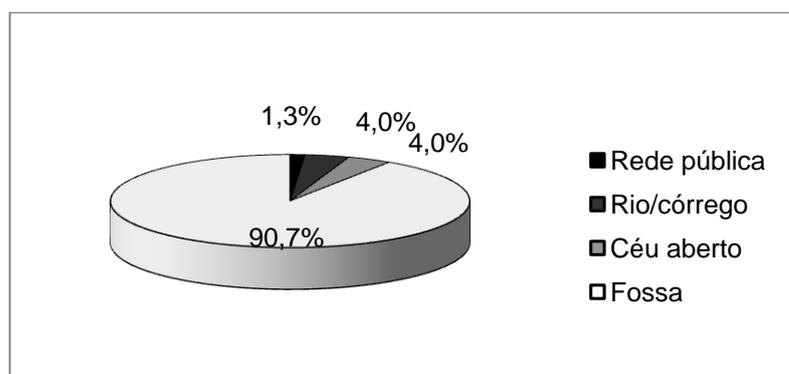
Quase que a totalidade das propriedades (97,3%), apresenta quintais com depósito de matéria orgânica, principalmente acúmulo de folhas e frutos decorrentes da atividade agrícola, cultivo de jardim, horta e pomar. Uma parcela menor de proprietários confirma também, a presença de resíduos sólidos como lixo e entulhos, gerados em decorrência de reformas, ou mesmo pelo simples acúmulo de material não mais utilizado (Figura 3).



**Figura 3** - Presença de material orgânico no quintal nas propriedades da região extremo-oeste de Santa Catarina, Brasil, 2012-2014.

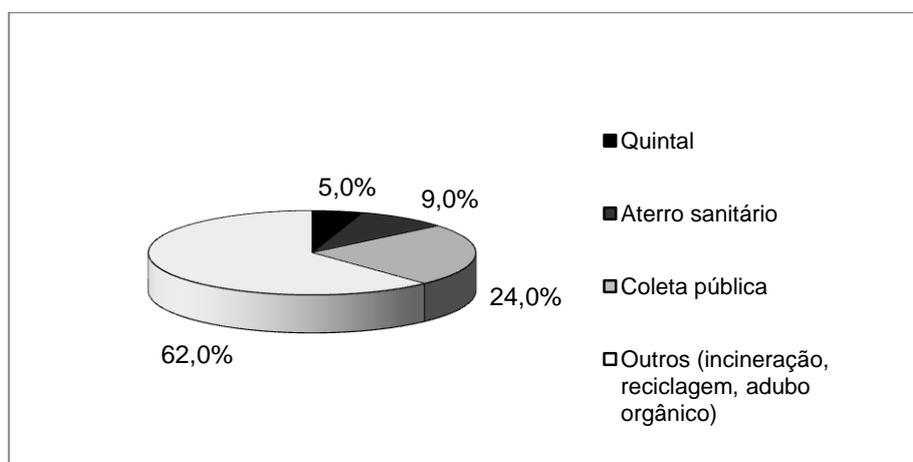
Uma análise com base nos resultados do destino do esgoto doméstico revelou que a grande maioria (90,7%) das propriedades conta com o sistema de eliminação dos resíduos domésticos (água da pia da cozinha, vaso sanitário, lavagem de roupas, água do banho) por meio da fossa séptica. Uma pequena

parcela utiliza como meio de eliminação desse tipo de resíduo os rios e córregos, a rede pública ou despejam a céu aberto (Figura 4).



**Figura 4** - Destino do esgoto das propriedades da região extremo-oeste de Santa Catarina, Brasil, 2012-2014.

Os resultados referentes ao destino do lixo doméstico mostraram que a maioria (62%) das propriedades usa destino alternativo para eliminação do lixo (incineração, adubo orgânico e reciclagem), ainda outra parcela conta com o sistema de coleta pública e a minoria acumula os resíduos no quintal ou joga em aterro sanitário (Figura 5).



**Figura 5** - Destino do lixo das residências da região extremo-oeste de Santa Catarina, Brasil, 2012-2014.

Dos 48 cães positivos por ambos os métodos sorológico e molecular, 19 (39,6%) apresentavam sinais clínicos compatíveis com LV. As manifestações clínicas mais comuns observadas foram as alterações de pele (alopécia, lesões ulcerativas e hiperqueratose), desidratação, perda de peso, onicogribose, linfadenopatia e anorexia (Tabela 6 e Figura 6).

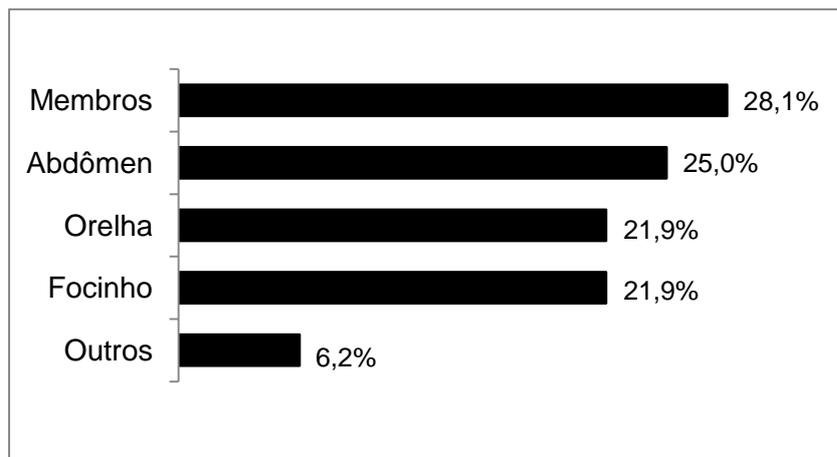
**TABELA 6 - SINAIS CLÍNICOS MAIS FREQUENTES OBSERVADOS NOS CÃES COM SOROLOGIA E/OU PCR POSITIVA (S) NA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA, BRASIL.**

Sinal clínico	Nº de animais positivos (%)
Alterações de pele	15 (31,2)
Desidratação	14 (29,2)
Perda de peso	13 (27,1)
Onicogrifose	12 (25,0)
Linfoadenopatia	10 (20,8)
Anorexia	6 (12,5)



**Figura 6 -** Alterações clínicas observadas nos animais com leishmaniose visceral da região extremo-oeste de Santa Catarina, Brasil. (A). Cão apresentando linfonodo aumentado. (B). Cão apresentando anorexia, desidratação, apatia, alopecia e lesões pelo corpo. (C). Cão com lesões de face e orelha. (D). Cão apresentando emagrecimento acentuado. Fonte: o autor.

A presença de lesões de pele é um achado clínico comum de LV nos cães. No total de animais estudados foi possível encontrar essa característica clínica em 32 (12,7%) cães, sendo que o local mais acometido foi a região dos membros, seguido de abdômen e cabeça (Figura 7).



**Figura 7** - Local da lesão de pele encontrada nos cães da região extremo-oeste de Santa Catarina, Brasil, 2012-2014.

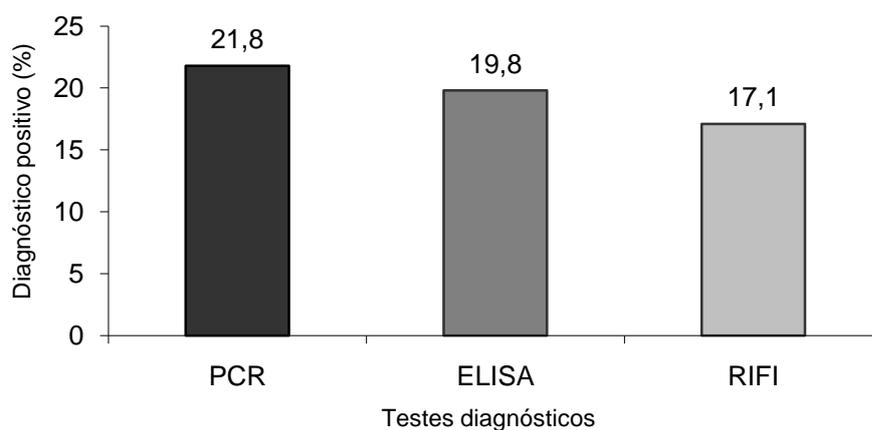
A análise estatística revelou que o diagnóstico positivo está estatisticamente associado com a raça e a idade ( $p \leq 0,05$ ) dos cães.

No presente estudo, entre os animais sintomáticos o método de ELISA foi o que apresentou maior positividade (46,4%). Entre os assintomáticos, a PCR foi a técnica mais eficiente na detecção de cães sem sintomatologia (63,6%) (Tabela 7).

**TABELA 7** - NÚMERO E PERCENTUAL DE ANIMAIS POSITIVOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL SEGUNDO OS MÉTODOS SOROLÓGICO (RIFI E ELISA) E MOLECULAR (PCR) E RELAÇÃO COM A FORMA CLÍNICA DA REGIÃO EXTREMO-OESTE DE SANTA CATARINA, BRASIL, 2012-2014.

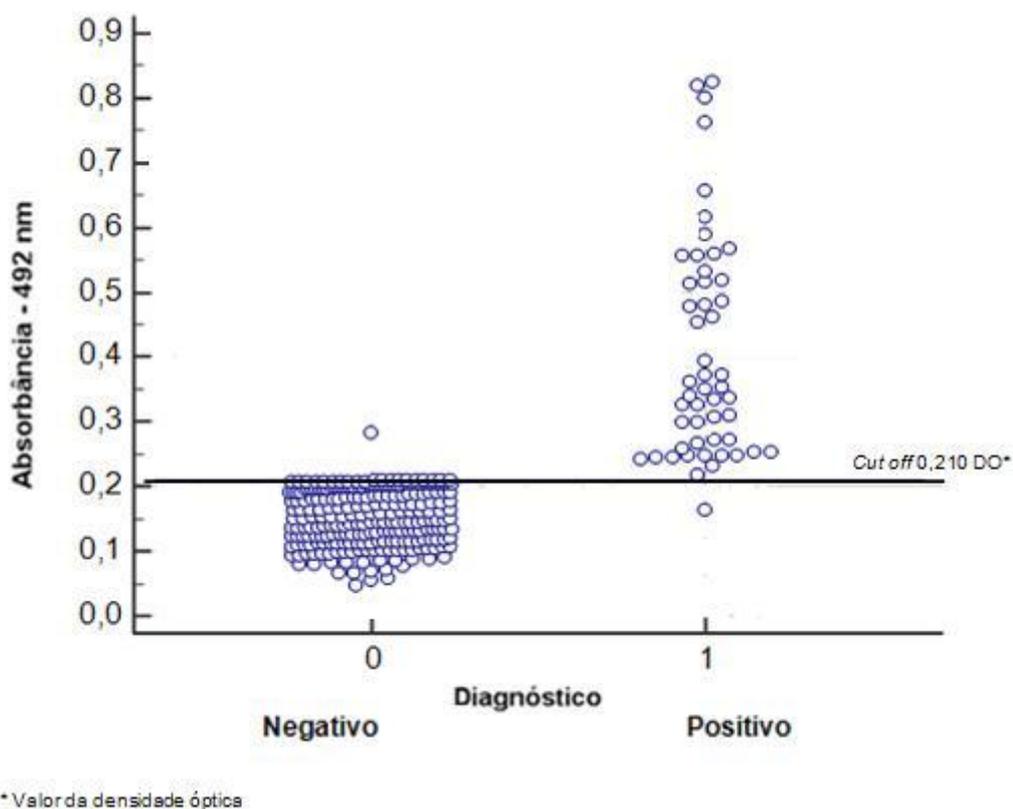
Forma clínica	Método	Número de positivos	% de positividade
Sintomático	ELISA	19	46,4
	RIFI	17	39,6
	PCR	20	36,3
Assintomático	ELISA	22	53,6
	RIFI	26	60,4
	PCR	35	63,6

Os métodos sorológicos permitiram identificar 43/252 cães positivos no RIFI e 50/252 no ELISA, na PCR 55/252 animais foram positivos para LV (Figura 8). Quarenta e oito cães (19,0%) foram positivos para LV em pelo menos dois métodos sorológico e/ou molecular. Cento e noventa e sete cães foram negativos.



**Figura 8** - Percentual de cães positivos para leishmaniose visceral de acordo com os testes sorológicos (RIFI e ELISA) e molecular (PCR) na região extremo-oeste de Santa Catarina, Brasil.

A prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* de 252 cães frente ao soro de animais sadios (Negativo) e possivelmente infectados (Positivo) são apresentados na Figura 9 (ponto de corte fornecido pela curva ROC).



**Figura 9** – Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* de 252 cães da região extremo-oeste de Santa Catarina, contra o soro de animais considerados sadios (Negativo) e infectados (Positivo) – Curva ROC. A linha horizontal representa o “cut-off” (fornecido pela curva ROC). As formas geométricas representam o resultado de um indivíduo.

Na análise da repetibilidade intra-ensaio os valores das densidades ópticas das amostras testadas em duplicata em uma mesma placa, para a detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, estão ilustrados na tabela 8.

**TABELA 8 - ANÁLISE DA REPRODUTIBILIDADE INTRA-ENSAIO PARA O TESTE ELISA (ANTI-*Leishmania*).**

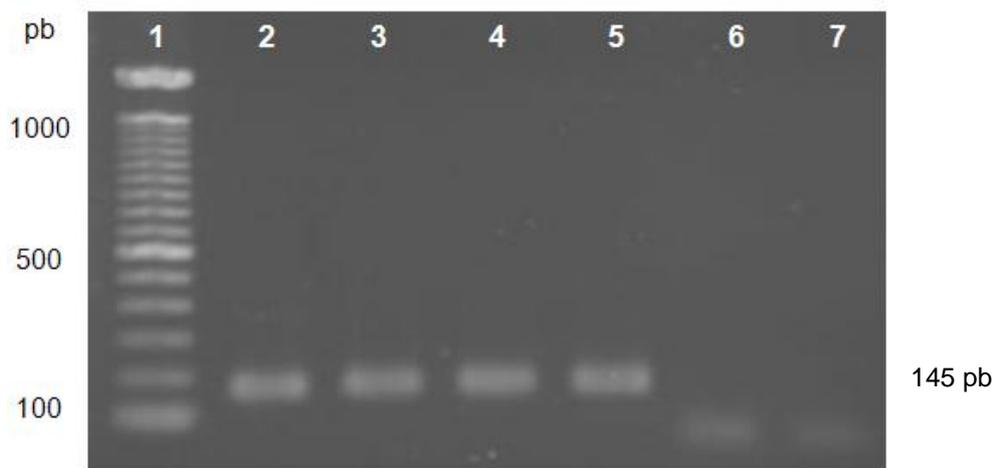
<b>Amostras</b>	<b>Absorbância</b>		<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Coefficiente de variação</b>
117	0,838	0,897	0,825	0,05	6%
	0,774	0,790			
233	0,193	0,200	0,187	0,01	5%
	0,174	0,182			

Na análise da repetibilidade inter-ensaio, os valores obtidos das densidades ópticas obtidos na detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, estão ilustrados na tabela 9.

**TABELA 9 - ANÁLISE DA REPRODUTIBILIDADE INTER-ENSAIO PARA O TESTE ELISA (ANTI-*Leishmania*).**

<b>ELISA (absorbância)</b>					
<b>Amostras</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Coefficiente de variação</b>
Controle negativo	0,181	0,160	0,120	0,03	15%
Controle positivo	1,407	1,173	0,94	0,14	10%

A técnica de PCR permitiu amplificar fragmentos de 145 pb, o que caracteriza *L. infantum* (Figura 10).



**Figura 10** - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando o perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de PCR usando os iniciadores RV1 e RV2 de amostras referência de *L. infantum* e amostras de sangue de animais da região extremo-oeste de Santa Catarina. 1 - Marcador molecular de 100pb (Invitrogen®); 2 - Amostra referência *L. infantum*; 3 – SMO81; 4 – SMO86; 5 – SMO168; 6 – Controle negativo usando sangue de cão livre da infecção; 7 - Controle negativo sem DNA.

A comparação dos resultados do teste sorológico (ELISA) e molecular (PCR), apresentando como referência as análises encontradas pela técnica de RIFI, é mostrada na Tabela 10.

**TABELA 10** - ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA ENTRE AS TÉCNICAS MOLECULAR E SOROLÓGICA, CUJO DESEMPENHO FOI ESTABELECIDO COM BASE NA COMPARAÇÃO À TÉCNICA DE REFERÊNCIA - RIFI.

Teste	RIFI (referência)					Valor p
	Sensib. (%)	Especif. (%)	VPP (%)	VPN (%)	Acurácia (%)	
<b>ELISA</b>	73,2	94,8	73,2	94,8	91,3	<0,0001*
<b>PCR</b>	100,0	94,3	82,9	100,0	95,2	<0,0001*

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; valor \*p ≤0.05

A análise dos dados de desempenho do teste de ELISA com base nos cálculos gerados pela curva ROC revela maiores valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo. Além disso, a área sob a curva (AUC) foi significativamente maior que 0,5 indicando que a técnica avaliada discrimina bem os resultados positivos e negativos (Tabela 11).

**TABELA 11 - ANÁLISE DOS DADOS DE DESEMPENHO DO TESTE DE ELISA COM BASE NOS CÁLCULOS GERADOS PELA CURVA ROC.**

<b>Curva ROC</b>						
<b>Teste</b>	<b>Sensib. (%)</b>	<b>Especif. (%)</b>	<b>VPP (%)</b>	<b>VPN (%)</b>	<b>AUC</b>	<b>Valor p</b>
<b>ELISA</b>	95,0	97,5	90,4	98,7	0,958	<0,0001*

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; AUC: Área sob a curva; Valor \*p ≤0.05

Em relação à análise de concordância Kappa, os cálculos determinados pelo Software Estatístico MedCalc (versão 13.2.0) revelaram:

**TABELA 12 - ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA KAPPA ENTRE AS TÉCNICAS RIFI, ELISA E PCR.**

<b>Testes</b>	<b>Valor de Kappa</b>	<b>Correlação</b>
<b>RIFI X ELISA</b>	0,618	Boa
<b>ELISA X PCR</b>	0,627	Boa
<b>RIFI X PCR</b>	0,849	Ótima

Dentre as técnicas realizadas, PCR foi a que apresentou maior sensibilidade (100%) e ELISA, pela determinação da curva ROC, maior especificidade (97,5%).

Na análise da comparação entre os testes aplicados, a PCR apresentou melhor desempenho cujo valor Kappa foi de 0,849 significando uma ótima concordância entre a mesma e a técnica de referência – RIFI.

## 7 DISCUSSÃO

O extremo-oeste de Santa Catarina, anteriormente considerada área indene, foi avaliado em relação às condições de risco para LV para os cães e, conseqüentemente, para o homem. Na análise preliminar escolheu-se trabalhar com cães como possíveis marcadores da presença do parasito. Foi realizado um estudo epidemiológico empregando as técnicas de RIFI, ELISA e PCR para a pesquisa de LV canina. A escolha destas técnicas deu-se por elas permitirem determinar a prevalência do parasito em cães sintomáticos e assintomáticos.

***Hipótese 1. Os cães que vivem em área rural, na presença de outros animais, na proximidade das matas (proximidade ao vetor), da raça veadeiro, são mais susceptíveis à infecção por Leishmania infantum.***

**Hipótese 1 aceita**, pois analisando a ocorrência de *L. infantum* nos animais da região, foi possível verificar a presença de fatores de risco. No presente estudo foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa, com maior número de cães positivos para a raça de cães veadeiros e animais com idade de 7 a 10 anos ( $p \leq 0,05$ ). Isso indica que os cães dessa raça específica, conhecidos pela atividade de caça estão mais suscetíveis ao contato com o vetor por viverem ou habitarem em matas e florestas. Cães positivos com idade mais avançada indicam mais tempo expostos ao risco de picada e à diminuição da imunidade, que por sua vez aumentam as chances de adquirir o parasito.

Inúmeros estudos indicam que o risco de infecção em cães por LV tende a aumentar com a idade uma vez a exposição à picada do vetor aumenta devido a maior período de susceptibilidade à transmissão (ABRANCHES *et al.*, 1991; FISA *et al.*, 1999; MOHEBALI *et al.*, 2005; DANTAS-TORRES *et al.*, 2009; GALVEZ *et al.*, 2010; ALONSO *et al.*, 2010; KALAYOU *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2011). Corroborando, estudos epidemiológicos realizados na Espanha e no Irã, revelaram que o maior percentual de prevalência para LV é observado em cães com mais de seis anos de idade (BALLART *et al.*, 2013; BARATI *et al.*, 2013). Galvez *et al.* (2010), estudando a correlação entre idade e a soropositividade, evidenciaram uma distribuição bimodal com um pico de positividade nos cães mais jovens (1-2 anos) e um segundo, mais evidente, com pico acerca dos cães mais velhos (7-8 anos).

Em relação ao sexo dos animais amostrados não foi encontrada diferença significativa. O sexo não tem sido considerado como importante fator de risco para LV canina (FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003; RONDON *et al.*, 2008).

Quanto à maior positividade em cães da raça veadeiro, nenhuma outra pesquisa com esse achado epidemiológico foi encontrada. A maioria dos estudos descreve que a raça dos cães não é significativa nem determinante para o desenvolvimento da infecção por *Leishmania* sp. (ALMEIDA *et al.*, 2009). É importante destacar que a grande variedade de raças em diferentes regiões dificulta uma homogeneidade nos resultados. O que de fato é comprovado, é que animais que vivem no peridomicílio, próximos às matas e florestas tendem a ficar mais susceptíveis, e a raça veadeiro, conhecidos pela atividade de caça, tem essa característica rural e, portanto, foram os mais acometidos pelo parasito *L. infantum* entre os animais investigados na presente pesquisa.

De acordo com os dados obtidos pelo questionário epidemiológico, foi possível observar que a grande maioria das propriedades com cães amostrados, localizava-se nas áreas rurais dos municípios, ressaltando que 72,9% dos animais com diagnóstico positivo estavam localizadas em região rural muito próxima às matas e florestas.

A presença de mata ou de muita vegetação nas proximidades das residências pode ser um fator de risco para a ocorrência de LV canina (BARBOSA *et al.*, 2010; BIGELI; OLIVEIRA JUNIOR; TELES, 2012). Esta associação pode ser explicada pelas condições necessárias para proliferação do vetor *Lu. longipalpis*, sendo mais abundante em áreas arborizadas do que em áreas urbanas e periurbanas (LAINSON; RANGEL, 2005). No litoral do Rio de Janeiro, foi observada uma correlação direta entre morar na proximidade da mata e a ocorrência de casos caninos (SILVA *et al.*, 2005). De maneira semelhante, também já foi verificada uma associação entre a proximidade com áreas com cobertura vegetal e a ocorrência de casos humanos de LV (GLÓRIA, 2006).

Considerando a origem dos animais, estudo desenvolvido no Mato Grosso revelou que animais que viviam em ambiente rural apresentavam risco 1,9 vezes maior de adquirir a infecção dos que aqueles em ambiente urbano. Segundo os autores, fatores relacionados aos hábitos dos animais, tais como o livre acesso à rua e função de guarda, foram considerados indicadores para ocorrência de infecção por *Leishmania* sp. (ALMEIDA *et al.*, 2012). Em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, a

abertura de avenidas acompanhando os cursos dos córregos e a derrubada da vegetação para construção de casas populares foram fatores de mudança do ambiente que podem ter contribuído para o aumento da densidade do vetor *L. longipalpis* e da introdução do parasito naquela cidade (FURLAN, 2010). O aumento da ocorrência de surtos urbanos de LV e a expansão geográfica da doença podem ser explicados por vários fatores, e nesse contexto o ambiente desempenha importante papel na dinâmica de transmissão de *L. infantum*. O desmatamento é um fator preponderante, uma vez que reduz a disponibilidade de fonte alimentar para os flebotomíneos, expondo o cão e o homem, que passam a ser as fontes mais acessíveis (MARCONDES; ROSSI, 2013).

Neste contexto, segundo Almeida *et al.* (2012), a presença de atividade agrícola também contribuiu para a ocorrência da infecção por LV. Oliveira *et al.* (2010), observaram que a maioria dos animais com diagnóstico positivo para LV vivem fora de casa, no ambiente rural. Esses achados indicam mais uma vez que a LV é uma zoonose predominantemente em zona rural e rural-urbana e que o convívio com outros animais aumenta expressivamente o risco de infecção canina.

Historicamente, a LV tem sua origem no ambiente rural, onde o padrão epidemiológico facilitava a circulação do agente transmissor. As construções localizadas nas bordas das matas possibilitavam a adaptação dos vetores no peridomicílio. A construção de casas próximas às reservas (menos de 100 m) permite a passagem do vetor do foco primário para o foco secundário, ou seja, a transmissão para o homem quando este adentrava à floresta não é mais a única maneira do homem contrair o parasito (BORGES *et al.*, 2009).

A atividade agrícola é a principal fonte de renda na região do extremo-oeste catarinense. A economia da região gira em torno do cultivo de grãos (milho, pipoca, soja, feijão), gado de leite, aviários e suinocultura. Toda essa característica agrícola gera um acúmulo significativo de matéria orgânica, promovendo o aparecimento de roedores e animais silvestres no entorno das propriedades. Assim como ocorre a migração desses reservatórios de LV para habitats mais próximos aos cães e aos humanos, também ocorre a colonização dos flebotomíneos no peridomicílio que, eventualmente, podem dar continuidade ao ciclo de transmissão do parasito. Essas condições tendem a expor mais o animal ao vetor e, portanto apresentam alto risco de infecção quando comparados aos animais de companhia que vive dentro de casa (DANTAS-TORRES, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2012; COURA-VITAL *et al.*, 2014). No

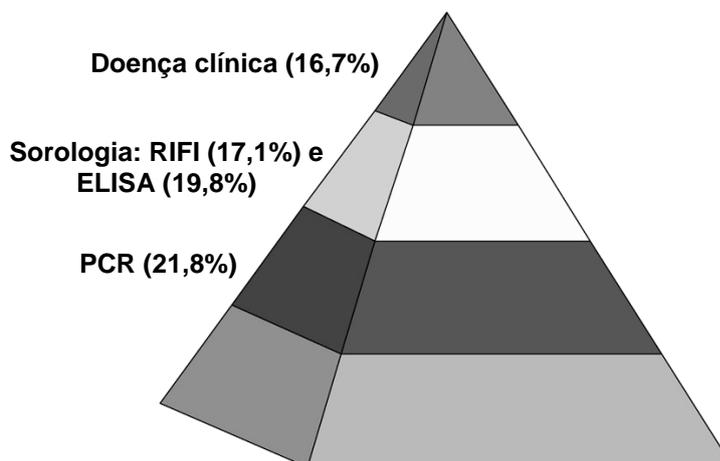
nordeste do Brasil, foi constatado que 67% dos pacientes humanos com LV possuíam animais em casa quando adoeceram, incluindo cães e animais de médio e grande porte (CESSE *et al.*, 2001). A criação de animais pode piorar as condições sanitárias locais devido à produção de resíduos orgânicos, o que favorece a atração e a manutenção do vetor no ambiente (FELICIANGELI, 2004; LAINSON; RANGEL, 2005).

Para Souza *et al.* (2006), a coabitação de cães com cavalos e muaras mostrou estar associada com o aumento na prevalência de LV. Belo *et al.* (2013), reportam que a presença de aves é um fator associado com a infecção por *Leishmania*, no ambiente doméstico. Está bem estabelecido que as aves domésticas atuam de forma expressiva no acúmulo de matéria orgânica e servem de fonte de alimento para o vetor (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Segundo Borges *et al.* (2009), a distribuição da LV na área urbana de Belo Horizonte (Minas Gerais), tem correlação com a presença de roedores, pássaros, patos e galinhas em 4,18; 1,81; 1,57; e 1,47 vezes, respectivamente. Para os proprietários de cães, o aumento no risco de contrair LV é equivalente a 2,17 vezes e está relacionado ao número de cães no domicílio. O risco de contrair LV é maior 1,87 vezes para moradores com um cão e 3,36 vezes para moradores com dois cães, quando comparados a pessoas que não possuem esses animais (BORGES *et al.*, 2009).

### ***Hipótese 2. Os animais positivos apresentam sinais e sintomas compatíveis com LV.***

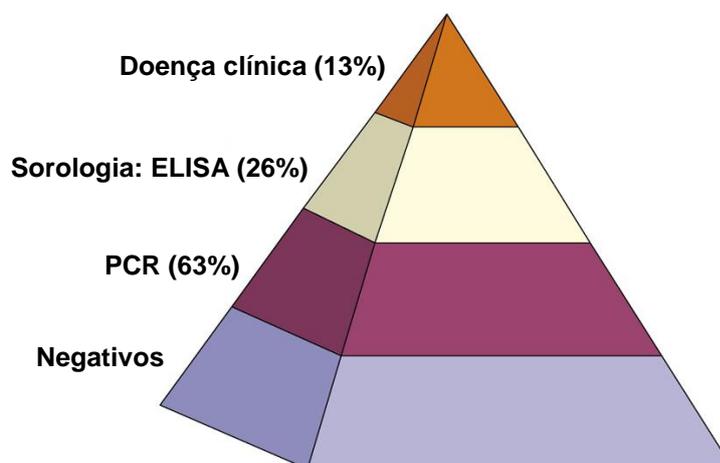
**Hipótese 2 aceita.** De 252 cães investigados, 16,7% apresentaram sinais clínicos de LV, 17,1% e 19,8% apresentaram sorologia positiva, para RIFI e ELISA, respectivamente e 21,8% foram positivos quando testados por PCR. Os resultados das três técnicas comportam-se de forma similar como a proposta por Solano-Galleno *et al.* (2001) (Figuras 11 e 12).



**Figura 11** - Representação esquemática dos resultados da distribuição de leishmaniose visceral na população canina da região extremo-oeste de Santa Catarina. O pico da pirâmide se refere aos cães amostrados com sinais clínicos da doença. Cães soropositivos representam a segunda fração. Mais frequente que cães com a doença clínica e soropositivos foram os cães diagnosticados pela PCR.

A maior parcela de cães positivos foram diagnosticados pela técnica molecular (PCR), logo a seguir os animais soropositivos que somam a segunda maior parcela e, a menor proporção se refere aos animais que apresentaram sinais clínicos compatíveis com LV.

Numa pesquisa com 100 cães na Ilha de Mallorca na Espanha, Solano-Galleno *et al.* (2001) encontraram resultados semelhantes aos da presente pesquisa onde a menor parcela de animais (13%) apresenta doença clínica aparente, 26% foram soroporeagentes e representando o maior número de casos, 63% diagnosticados positivos pela detecção de DNA de *Leishmania* quando testados por PCR (Figura 12).



**Figura 12** - Representação dos resultados da distribuição de leishmaniose visceral na população canina em região com foco endêmico. O topo da pirâmide consiste nos cães com sinais clínicos da doença. Cães soropositivos sem sinais da doença representam a segunda fração. A terceira fração inclui animais assintomáticos PCR positivos, mas soronegativos infectados, e a quarta fração inclui cães que são soronegativos e não retém o parasito. Fonte: SOLANO-GALLENO *et al.*, 2001.

Estudos sobre a infecção por *L. infantum* em cães, revelam que a prevalência da parasitose é alta em áreas endêmicas (20 a 40%), porém a prevalência da doença clínica ocorre entre 3 a 10%, demonstrando que a maioria dos cães infectados não desenvolve sinais clínicos, o que dificulta o diagnóstico e, conseqüentemente o controle da LV (BANETH *et al.*, 2008; PALTRINIERI *et al.*, 2010).

A prevalência de *L. infantum* e anticorpos anti-*Leishmania* pode variar de acordo com a região geográfica, pressão parasitária e o método de diagnóstico utilizado (BARBOSA *et al.*, 2010; COURA-VITAL *et al.*, 2011; FELIPE *et al.*, 2011).

Estudos usando como técnica de diagnóstico a PCR em áreas endêmicas têm confirmado que a prevalência de infecção em cães é muito maior do que a proporção de animais que efetivamente desenvolve a doença (SOLANO-GALLENO *et al.*, 2001; ALVAR *et al.*, 2004).

A diferença entre as prevalências de animais positivos por PCR em nossa pesquisa (21,8%) e no estudo de Solano-Galleno *et al.* (2001) (63%), pode ser explicada pela pressão parasitária naquele país que é endêmico enquanto que na região do extremo-oeste o ciclo do parasito pode estar se estabelecendo nos últimos anos. Também houve diferença na amostra biológica usada para realização da técnica. Em nossa pesquisa foi usada camada leucocitária de sangue periférico, enquanto que os autores utilizaram diferentes tecidos, como pele, conjuntiva e medula óssea, que são amostras biológicas mais indicadas para pesquisa do DNA de *L. infantum*, por apresentarem melhores resultados quanto a sensibilidade da técnica.

Amostras de sangue periférico, para pesquisa de DNA de *Leishmania*, apesar da vantagem de ser menos invasiva, muitas vezes, pode apresentar sensibilidade inferior àquela obtida com outros tecidos. A carga parasitária tende a ser menor, além de conter certos inibidores de PCR que podem afetar a sensibilidade da técnica (REITHINGER *et al.*, 2002). Na presente pesquisa a técnica de PCR foi a que apresentou maior número de animais positivos com valor de sensibilidade de 100% e especificidade de 94,3%.

Resultados variáveis e conflitantes com relação à sensibilidade da PCR podem ser observados em diferentes amostras biológicas caninas. A distribuição heterogênea dos parasitos em cada tecido, devido ao tropismo da cepa e também à

resposta imune local, pode explicar tais variações. Quinell *et al.* (2001) demonstraram, em estudo longitudinal com cães naturalmente infectados, que a sensibilidade da PCR era mais elevada logo após a infecção; posteriormente, declina à metade. A pele tem sido um dos tecidos mais utilizados e apresenta como vantagens, a facilidade de obtenção, a distribuição homogênea de parasitos, independente da região do corpo na qual foi coletada além do alto parasitismo.

Na Grécia, de 73 cães clinicamente saudáveis, 12,3% foram positivos para LV usando a sorologia e 63% diagnosticados por PCR (LEONTIDES *et al.*, 2002).

Estudos em áreas endêmicas têm mostrado que a história natural de infecção dos cães pode envolver dois diferentes caminhos (QUINNELL *et al.*, 2001; OLIVA *et al.*, 2006). Em alguns cães a severidade dos sinais clínicos, aparece logo após a infecção. Confirmando a hipótese de que animais com doença clínica são incapazes de desenvolver a efetiva resposta imune celular, embora eles tenham uma forte, mas ineficaz resposta humoral (BARBIERI, 2006). E outros animais permanecem infectados por um longo período (anos ou a vida toda), sendo capazes de evitar o aparecimento e desenvolvimento de lesões e a doença clínica. No entanto, esses animais clinicamente saudáveis, quando acometidos por alguma doença imunossupressora, ou quando há necessidade de administração de drogas imunossupressoras, pode levar a ativação da infecção latente e, conseqüentemente, o desenvolvimento dos sinais clínicos.

Esses dois conceitos esclarecem que a infecção clínica de LV canina é somente o topo do iceberg em áreas endêmicas, e a maioria da população que está exposta, começa a infecção sem apresentar clínica evidente da doença ou soro com anticorpos anti-*Leishmania* (BANETH *et al.*, 2008).

No modelo comportamental da LV canina, foi assumido que cães assintomáticos não são infectantes para o vetor. No entanto, alguns estudos mostram que a infectividade dos cães apresentando *L. infantum* não é exclusivamente associada com o estágio sintomático da doença. Segundo Molina *et al.* (1994) três de cinco cães assintomáticos, mas soropositivos, transmitiram o parasito para o vetor. Os resultados encontrados por Solano-Galleno *et al.* (2001), também apóiam a hipótese que cães assintomáticos podem ser considerados infectantes para os flebotomíneos. A pesquisa mostrou que 54% dos cães saudáveis vivendo em área onde *L. infantum* é endêmica, devem ser considerados portadores assintomáticos do parasito.

**Hipótese 3. O diagnóstico de LV canina deve apresentar boa sensibilidade e especificidade, portanto, as técnicas “in house” são confiáveis e detectam o número real de cães parasitados.**

**Hipótese 3 aceita.** Em uma primeira análise, ao comparar entre si as técnicas de diagnóstico usadas neste trabalho, tendo como padrão ouro o teste de RIFI, foram determinadas as sensibilidades e especificidades das técnicas ELISA e PCR.

A avaliação metodológica do nível de corte entre reação positiva e negativa para o teste ELISA usando a curva ROC foi fundamental. A análise revelou dados importantes, proporcionando melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade. A sensibilidade calculada com auxílio da curva ROC foi de 95,0% e o cálculo utilizando o teste de RIFI como referência apresentou sensibilidade de 73,2%, demonstrando que a aplicação da metodologia é importante para detectar os indivíduos verdadeiramente positivos.

A mesma situação pode ser evidenciada quando são analisados os valores de especificidade calculados com auxílio da curva ROC, o teste de ELISA apresenta valores maiores de 97,5% e o cálculo utilizando o teste de RIFI como referência a especificidade foi de 94,8%. A diferença entre os resultados de especificidade é menor, no entanto a aplicação da metodologia ROC ainda assim é importante para detectar o maior número de animais infectados. Portanto, verificou-se que a técnica de ELISA, em ambas as análises, apresenta alta especificidade e consegue detectar maior número de animais com infecção ativa, subclínica ou inaparente.

A maioria dos estudos relacionados à detecção da Leishmaniose visam o diagnóstico da forma canina da doença, especialmente para LV e nestes observa-se que as sensibilidades e especificidades encontradas pelo teste ELISA foram respectivamente 100% e 98% (PORROZI *et al.*, 2007), 88 e 95% (FARIA *et al.*, 2011), 76 a 100% (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Estudos realizados por Figueiredo *et al.* (2010) e Silva *et al.* (2013) mostraram positividade de 6,2% e 17% no teste de ELISA, com sensibilidade de 100% e especificidade de 96,6% e 92%, respectivamente.

A técnica de imunofluorescência permitiu detectar anticorpos anti-*Leishmania* em 17,1% dos cães. Essa técnica foi empregada no estudo da prevalência da LV canina na maioria dos trabalhos no Brasil (FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003;

FIGUEIREDO *et al.*, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2012; FRAGA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013). Estes autores relatam prevalência que variaram de 9,7% a 36,4%. Usando RIFI como método de diagnóstico, Almeida *et al.* (2012), encontraram 22,1% dos cães estudados positivos para LV na cidade de Cuiabá, em Mato Grosso.

Na presente pesquisa, a técnica de PCR detectou DNA do parasito em 21,8% dos cães, com sensibilidade e especificidade de 100% e 94,3%, respectivamente, corroborando com os resultados encontrados por Manna *et al.* (2004). Testes moleculares baseados na PCR, conhecidamente possuem bons índices de sensibilidade (acima de 90%) e especificidade para o diagnóstico de até 100% (LACHAUD *et al.*, 2002; DISCH *et al.*, 2003; CALVOPINA; ARMIJOS; HASHIGUCHI, 2004; IKEDA-FEITOSA *et al.*, 2006; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011; DANTAS-TORRES *et al.*, 2012).

Lachaud *et al.* (2002) relatam que dentre os seis pares de *primers* avaliados em seu trabalho, RV1/RV2 possuem resultados de fácil interpretação, apresentam raros artefatos na corrida do gel de agarose e os consideram como *primers* extremamente sensíveis capazes de detectar indivíduos assintomáticas.

De maneira geral, a PCR é mais eficiente para detectar estágios iniciais da infecção, até mesmo antes da soroconversão, ao contrário das técnicas sorológicas que são mais eficientes para os estágios mais avançados da infecção, quando as IgGs já foram produzidas e são facilmente detectáveis (QUINEL *et al.*, 2001; IKEDA; FEITOSA, 2006; OLIVA *et al.*, 2006).

Segundo Fakhar *et al.* (2008), devido à grande quantidade de cópias apresentadas pelo minicírculo do cinetoplasto, é de se esperar que uma PCR utilizando os *primers* RV1/RV2 seja mais sensível até mesmo do que uma Nested-PCR utilizando microsátélites de cópia única, porque os múltiplos minicírculos podem estar presentes na amostra utilizada para a PCR mesmo após diversas diluições.

Assis *et al.* (2010), comparando métodos diagnósticos em um grupo de cães naturalmente infectados, concluíram que a PCR foi o teste que apresentou maior positividade para o diagnóstico definitivo da doença, quando os testes parasitológicos e sorológicos não foram capazes de detectar cães positivos para LV canina. Os dados de Moreira *et al.* (2007), também corroboram estes resultados. Ikeda e Feitosa (2006) ao avaliarem a técnica de PCR observaram sensibilidade de 88% logo após a infecção, declinando nos meses seguintes. E a sensibilidade da

sorologia foi baixa no início da infecção (41%), mas alta (93-100%) nas fases subsequentes. Isso demonstra que durante infecções naturais, vários métodos devem ser utilizados, tendo em vista que uma única técnica não pode identificar todos os animais infectados (IKEDA; FEITOSA, 2006).

Neste estudo, a prevalência por sorologia e/ou técnica molecular foi de 19,0%. No Rio Grande do Sul, um inquérito sorológico canino no município de São Borja revelou, até o final de 2010, prevalência de 22,5% para LV. Já na cidade de Uruguaiana, no mesmo estado a prevalência encontrada foi de 14%. Em Porto Alegre, a prevalência, até 2010, era de 4,1% em 72 amostras (TARTAROTTI *et al.*, 2011). Em 2013, outro estudo realizado na capital gaúcha, avaliando a prevalência de LV em 140 cães por teste imunocromatográfico (TR-DPP), revelou que 2,1% dos cães apresentaram positividade (TEIXEIRA *et al.*, 2013). O total de amostras sorológicas caninas analisadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do estado do Rio Grande do Sul (IPB-LACEN/RS), no período de 2009 a 2010, foi de 5.430, com 20,8% de cães sororreagentes, distribuídos em 34 municípios (TARTAROTTI *et al.*, 2011).

No Paraná, estudo realizado por Dias *et al.* (2013) na cidade de Foz do Iguaçu, revelou prevalência de LV canina de 31% e 7,2% para ELISA e RIFI, respectivamente.

Esses dados de prevalência de LV canina nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná revelam que a maioria dos casos nesses estados são registrados em municípios de fronteira com o país argentino, logo também, muito próximos à divisa com o Paraguai. Isso indica a relação de transmissão entre essas regiões (argentina e paraguaia) com focos de LV e as cidades brasileiras de fronteira. Dessa forma, ao encontrarmos cães positivos para *L. infantum* na região extremo-oeste do estado de Santa Catarina, confirma nossa hipótese inicial, mostrando a distribuição acelerada do vetor e conseqüentemente do parasito para regiões consideradas indenes em fronteira com regiões endêmicas.

Em Assunção, no Paraguai, os índices de LV canina saltaram de 3,1% para 11,8% entre 1997 e 1999, com casos humanos encontrados na mesma área em 2003 e 2004. Em Posadas (Misiones) na Argentina, área endêmica para LV, Cruz *et al.* (2010) obtiveram prevalência 57,3% em cães diagnosticados por sorologia e/ou PCR.

Em nosso estudo, dos 48 (19,0%) cães positivos por sorologia e/ou técnica molecular para *L. infantum*, 19 (39,6%) apresentavam sinais clínicos compatíveis com LV. A presente pesquisa confirma a presença de cães positivos para LV e corrobora com os achados clínicos de outros autores (ALMEIDA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010; CUNHA *et al.*, 2012; FERNÁNDEZ-COTRINA *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2013; BALLART *et al.*, 2013). Do total 59,2% dos cães eram assintomáticos, mas com sorologia ou PCR positivos, dados que corroboram com a literatura (MADEIRA *et al.*, 2004; DANTAS-TORRES, 2006; RONDON, *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010; CUNHA, *et al.*, 2012; STEINDEL, *et al.*, 2013) e contribuem para a hipótese de que animais assintomáticos atuam como reservatórios do parasito, e são importante fonte de infecção para os flebotomíneos (CARDOSO; MENDÃO; CARVALHO, 2012; MOHAMMADIHA *et al.*, 2013). A presença de 50 a 70% de cães assintomáticos, potencialmente infectantes para o vetor, denota a importância dos inquéritos sorológicos caninos para que se antecipem as ações profiláticas, já que os casos caninos precedem ou estão relacionados com a infecção em seres humanos (MADEIRA *et al.*, 2004). Segundo Michalsky *et al.* (2007) a capacidade dos reservatórios infectarem flebotomíneos é maior para os cães sintomáticos (28%) que os assintomáticos (5,4%). Porém, em recente estudo na cidade de Florianópolis em onze cães diagnosticados com LV, 90,9%, incluindo quatro animais assintomáticos, apresentaram elevado parasitismo (STEINDEL *et al.*, 2013), mostrando que em condições favoráveis (alta densidade do vetor), cães assintomáticos podem contribuir para a transmissão do parasito.

***Hipótese 4. A ocorrência de *L. infantum* em cães da região é esperada pela proximidade com áreas de transmissão e pela presença de cães com sinais e sintomas compatíveis com LV.***

**Hipótese 4 aceita** pelo encontro de animais positivos na área de estudo, prevalentemente pela proximidade com áreas de transmissão de *L. infantum*. Todos os casos de LV canina foram avaliados epidemiologicamente com levantamento da procedência dos animais e tempo de residência. Verificou-se que os cães positivos para *L. infantum* eram procedentes das áreas de residência e adoeceram ali, sendo, portanto, em sua maioria, casos autóctones. A ocorrência de animais positivos na região extremo-oeste de Santa Catarina, deve ter o diagnóstico confirmado por

isolamento do parasito e/ou captura do flebotomíneo. Pelo fato da LV ser uma zoonose e ter o cão doméstico como o principal reservatório, os casos diagnosticados devem ter avaliação epidemiológica e vetorial, pois a migração desses animais pode disseminar a doença para outras regiões, desde que encontrem ecótopo adequado e vetor específico.

Considerando a importância zoonótica, a alta letalidade e a disseminação da LV no Brasil e países vizinhos, a avaliação de animais suspeitos procedentes de áreas ou regiões com casos da doença, torna-se importante para a saúde pública, uma vez que esta zoonose e seus vetores apresentam alto potencial de disseminação e adaptação, principalmente em áreas que apresentam crescimento urbano, mudanças climáticas, desmatamento e más condições sócio-econômicas, evidenciados em quase todo o país (BRASIL, 2006).

Na região extremo-oeste de Santa Catarina, o papel do cão na manutenção do ciclo da *Leishmania*, se destaca como um elo entre os ciclos silvestre e rural-urbano, servindo como um amplificador do ecossistema da LV nesta área.

Em resumo a presente pesquisa conseguiu identificar na região extremo-oeste de Santa Catarina, um grande número de animais com *L. infantum*, confirmando o diagnóstico por diferentes técnicas. Essa pesquisa preliminar revela a possibilidade não apenas de foco de LV canina, mas também a possibilidade de aparecimento de casos humanos no futuro. É uma necessidade epidemiológica investigar, conhecer e avaliar os casos caninos positivos, a fim de evitar que esses animais permaneçam no ambiente doméstico como fonte de infecção para o vetor.

O conhecimento sobre a prevalência e os fatores de riscos na epidemiologia da LV canina na região extremo-oeste de Santa Catarina, considerando sua proximidade com regiões com focos da doença, será de grande valia, contribuindo para uma definição de estratégias para o controle da doença naquela região. Torna-se necessário a implantação de uma política de vigilância, com integração de informação entre os órgãos da área de saúde (Municipal, Estadual e Federal) e investigação epidemiológica de todos os casos caninos para a prevenção e controle da LV na área.

## 8 CONCLUSÕES

Com base no conjunto de dados obtidos no presente estudo foi possível concluir que:

- Os cães desempenham importante papel como sinalizadores na LV, em função da susceptibilidade da espécie ao parasito, da resposta frente ao patógeno e principalmente pelo relevante risco à saúde pública, por sua proximidade com os humanos.
- Características físicas do cão (idade e raça) e comportamento (habitat rural-urbano, presença de matas e outros animais, livre acesso à rua, função de guarda), são alguns dos fatores de risco associados à infecção.
- As técnicas sorológicas convencionais (RIFI 17,1% e ELISA 19,8%) subestimam o número de cães infectados.
- As técnicas moleculares (PCR 21,8%) são mais acuradas na identificação do parasito em cães assintomáticos. Entretanto, é necessária a automação desta técnica, para que possam ser empregadas em larga escala.
- Através da análise de concordância do índice Kappa, os melhores resultados obtidos foram entre as técnicas de PCR e RIFI (0,849), seguido por ELISA e PCR (0,627) e, por fim, ELISA e RIFI (0,618).
- Este estudo preliminar relata a primeira pesquisa e confirma a presença de *L. infantum* nos municípios de São Miguel do Oeste e Descanso na região do extremo-oeste do estado de Santa Catarina, mostrando a possibilidade não apenas de foco de LV canina como também para a possibilidade do aparecimento de casos humanos no futuro.

## 9 PERSPECTIVAS

- Estudo parasitológico poderá ser realizado, no intuito de isolar o parasito para sua correta identificação.
- Um estudo filogenético oferecerá importantes informações sobre como o parasito chegou nessa região de fronteira com a Argentina ou os estados do Paraná e Rio Grande do Sul.
- Estudo entomológico para encontro de *Lu. longipalpis*.
- Retomada dos testes de ELISA e RIFI como métodos preconizados pelo Ministério da Saúde para diagnóstico de LV canina.
- Ações de vigilância e controle da LV canina normatizadas no Brasil estão centradas no diagnóstico precoce, vigilância e monitoramento canino com eutanásia de cães com diagnóstico sorológico ou parasitológico positivos, vigilância entomológica, saneamento ambiental, controle químico com inseticida de efeito residual.
- Medidas preventivas direcionadas ao homem, ao vetor e ao cão, devem ser aplicadas a fim de evitar novos casos caninos e futuros casos humanas.

## REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, P. *et al.* Canine leishmaniosis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **International Journal for Parasitology**, v. 77, n. 4, p. 557–561, 1991.
- ALMEIDA, A. B. P. F. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 4, p. 359-365, 2012.
- ALMEIDA, A. B. P. F. *et al.* Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p.156-159, 2009.
- ALONSO, F. *et al.* Geographical variation and factors associated to seroprevalence of canine leishmaniosis in an endemic Mediterranean area. **Zoonoses Public Health**, v. 57, n. 5, p. 318–328, 2010.
- ALVAR, J. *et al.* Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.
- ALVAR, J. *et al.* The WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v. 7, n. 5, e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671, 2012.
- ASSIS, J. *et al.* Estudo Comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2010.
- BALLART, C. *et al.* First survey on canine leishmaniasis in a non classical area of the disease in Spain (Lleida, Catalonia) based on a veterinary questionnaire and a cross-sectional study. **Preventive Veterinary Medicine**, v.109, n. 1-2, p. 116– 127, 2013.
- BANETH, G. *et al.* Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.
- BARATI, M. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence survey of asymptomatic dogs in an endemic area of northwestern Iran. **Journal of Parasitic Diseases**. Springer, 2013.
- BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 329–337, 2006.
- BARBOSA, D. S. *et al.* Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 653-659, 2010.
- BARRIO, A. *et al.* *Leishmania infantum* and Human Visceral Leishmaniasis, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 354-355, 2012.

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, 2013.

BIGELI, J. G.; OLIVEIRA JUNIOR, W. P.; TELES, N. M. M. Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 18-23, 2012.

BORGES, B. K. A. *et al.* Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1035-1043, 2009

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federativas**. 2014. Disponível em:<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>. Acesso: 6 mai. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, DF: 6 ed., 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília. 7 ed., 2010b.

BRAVO, A. G., *et al.* The first record of *Lutzomyia longipalpis* in the Argentine northwest. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 8, p. 1071-1073, 2013.

CALVOPINA, M.; ARMIJOS, R. X.; HASHIGUCHI, Y. Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 7, p. 663-672, 2004.

CANESE, A. Leishmaniosis visceral canina en el área metropolitana de la “Gran Asunción”, Paraguay. **Medicina (B Aires)**, v. 60 (Supl III), p. 65, 2000.

CARDOSO, L.; MENDÃO, C.; CARVALHO, L. M. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 62, 2012.

CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; AUGUR, C. Standardization of ELISA (Enzyme linked immunosorbent Assay) and Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) techniques for canine cutaneous leishmaniasis. In: ROUSSOS, S. *et al.* (Eds.). **New Horizons in Biotechnology**. [S.l.]: Kluwer Academic Publishers, p. 421-428, 2003.

CASTRO E.A. de **Aspectos epidemiológicos e Parasitológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana em duas Regiões do Estado do Paraná e o Papel do cão na Manutenção do Ciclo de *Leishmania***. 2001. Tese (Doutorado em Zoologia) – Universidade Federal do Paraná, 2001.

CESSE, E. A. P. *et al.* Organização do espaço urbano e expansão do Calazar. **Revista Brasileira de Saúde Materno e Infantil**, v. 1, n. 2, p. 167-76, 2001.

CORTES, S. *et al.* Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 189, n. 2-4, p. 189-196, 2012.

COURA-VITAL, W. *et al.* Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, 2011.

COURA-VITAL, W. *et al.* Risk Factors for Seroconversion by *Leishmania infantum* in a Cohort of Dogs from an Endemic Area of Brazil. **PloS One**, v. 8, n. 8, 2014.

COUSIÑO, B. **Vigilancia y Control de la Leishmaniasis en el Paraguay. Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas**, Panaftosa, Rio de Janeiro, Brazil Organización Panamericana de la Salud, p. 34-36, 2006.

CRUZ, I. *et al.* A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina). **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 342, 2010.

CUNHA, R.C. *et al.* Laboratory diagnosis and clinical signs of canine visceral leishmaniasis in dogs examined at the center for zoonosis control in Campo Grande – MS, Brazil. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, n. 4, p. 17-26, 2012.

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

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 3, p. 537-41, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, v. 2, Supplement N. 1, 2009. doi: 10.1186/1756-3305-2-S1-S1. Acesso: 11 set. 2013.

DIAS, R. C. F. *et al.* **Occurrence of anti-*Leishmaniaspp.* Antibodies in domiciled dogs from the city of Foz do Iguaçu, state of Paraná, Brazil**. In: Fifth World Congress on Leishmaniosis, pp. 826, 2013.

DISCH, J. *et al.* Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 4, p. 391-395, 2003.

- FAKHAR, M. *et al.* Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v.102, p.1–7, 2008.
- FARIA, A. L. *et al.* High-Throughput Analysis of Synthetic Peptides for the Immunodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 9, p.1309, 2011.
- FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 1, p. 71-80, 2004.
- FELIPE, I. M. A. *et al.* *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 2, p. 207-211, 2011.
- FERNANDEZ-COTRINA, J. *et al.* Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniasis by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 118-128, 2013.
- FIGUEIREDO, F. B. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 52, n. 4, p. 193-6, 2010.
- FIGUEIREDO, F. B. *et al.* Leishmaniose Visceral Canina: Dois casos autóctones no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 1, p. 1026, 2012.
- FISA, R. *et al.* Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. **Veterinary Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 87–97, 1999.
- FRAGA, D. B. *et al.* Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 190, n. 3-4, p. 591-594, 2012.
- FRANÇA-SILVA, J. C. *et al.* Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 2-3, p. 161-173, 2003.
- FREHSE, M. S. *et al.* Surveillance of canine visceral leishmaniasis in a disease-free area. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 62-64, 2010.
- FURLAN, M. B. G. Epidemia de leishmaniose visceral no Município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 15-24, 2010.
- GÁLVEZ, R. *et al.* Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 3-4, p. 327–334, 2010.

GLÓRIA, M. R. B. **Leishmaniose visceral: situação epidemiológica e distribuição especial, município de Palmas, Tocantins**. 2006. 86 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2006.

GOULD, I.T. *et al.* Leishmaniasis visceral en la Argentina: notificación y situación vectorial (2006-2012). **Medicina** (B Aires), v. 73, n. 2, p. 104-110, 2013.

IKEDA, F. G.; FEITOSA, M. M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, v. 11, n. 1, p. 32-38, 2006.

KALAYOU S. *et al.* Serological evidence of *Leishmania donovani* infection in apparently healthy dogs using direct agglutination test (DAT) and rk39 dipstick tests in Kafta Humera, north-west Ethiopia. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 58, n. 3, p. 255–262, 2011.

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

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

LEONTIDES, L. S. *et al.* A cross-sectional study of *Leishmania* spp. Infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 19–27, 2002.

MADEIRA, M. F. *et al.* Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* Isolated from Healthy Skin of Symptomatic and Asymptomatic Dogs Seropositive for Leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 440-444, 2004.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MANNA, L. *et al.* Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MARZOCHI, M. C. A. *et al.* Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco epidemiological aspects and control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 570-580, 2009.

METZ, C. E. Basic principles of ROC analysis. **Semin Nucl Med**, v. 8, p. 283-289, 1978.

- MICHALSKY, E.M. *et al.* Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**, v.147, n. 1-2, p. 67–76, 2007.
- MOHAMMADIHA, A. *et al.* Canine visceral leishmaniosis: A comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 83-90, 2013.
- MOHEBALI, M. *et al.* Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3–4, p. 243–251, 2005.
- MOLINA, R. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 4, p. 491–493, 1994.
- MOREIRA, M. A. B. *et al.* Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v.145, n. 3-4, p. 245-52, 2007.
- MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitology**, v.18, n. 9, p. 399-405, 2002.
- NASCIMENTO, M. S. *et al.* Naturally *Leishmania infantum*-infected dogs display an overall impairment of chemokine and chemokine receptor expression during visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.153, n. 3-4, p.202-208, 2013.
- NICOLLE, C. J. 'Sur trois cas d' infection splénique infantile à corps de *Leishman* observés en Tunisia'. **Archives du Institute Pasteur de Tunisia**, n° 3, pp. 1-26, 1908.
- OLIVA, G. *et al.* Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1318–1322, 2006.
- OLIVEIRA, L. C. P. *et al.* Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Ávila, State of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 400-404, 2010.
- OLIVEIRA, S. G. G. *et al.* Characterization of Novel *Leishmania infantum* Recombinant Proteins Encoded by Genes from Five Families with Distinct Capacities for Serodiagnosis of Canine and Human Visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 6, p. 1025-1034, 2011.
- PALTRINIERI, S. *et al.* Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia, teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 596p.

PLANO DIRETOR MUNICIPAL, São Miguel do Oeste – SC, (PDM – SMO), Nov. 2009.

PORROZZI, R. *et al.* Comparative Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Based on Crude and Recombinant Leishmanial Antigens for Serodiagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania infantum* Visceral Infections in Dogs. **Clinical and vaccine immunology**, v. 14, n. 5, p. 544-548, 2007.

QUINNELL, R. J. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v. 122 (Pt.3), p. 253-261, 2001.

REITHINGER, R. *et al.* Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2352–2356, 2002.

RONDON, F. C. M. *et al.* Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. **Veterinary Parasitology** v. 155, n. 1-2, p. 24-31, 2008.

SALOMON, O. D. *et al.* First visceral leishmaniasis focus in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 109-111, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SANTINI, M. S. *et al.* *Lutzomyia longipalpis* abundance in the city of Posadas, northeastern Argentina: variations at different spatial scales. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 6, p. 767-771, 2012.

SANTOS, D. R.; FERREIRA, A. C.; BISETTO-JUNIOR, A. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 643-645, 2012.

SILVA, A. V. M. *et al.* Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 324- 328, 2005.

SILVA, D. A. *et al.* Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **The Veterinary Journal**, v. 195, n. 2, p. 252–253, 2013.

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

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560–563, 2001.

SOUSA, S. *et al.* Seroepidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. **Acta Tropica**, v. 120, n. 1–2, p. 82–87, 2011.

SOUZA, V. M. M. *et al.* Estudo epidemiológico de um surto de leishmaniose visceral numa área de manguezal. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 76, n. 1, p. 14–24, 2006.

STEINDEL, M. *et al.* Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 490-496, 2013.

SZARGIKI, R. *et al.* Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47-52, 2009.

TARTAROTTI, A. L. *et al.* **Boletim Epidemiológico**. Equipe de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre, v. 13, p.5-6, 2011.

TEIXEIRA, M. C. *et al.* **Occurrence of seropositivity for *Leishmania infantum chagasi* in dogs from built-up areas of the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul-Brazil**. In: fifth World Congress on Leishmaniosis, pp. 854, 2013.

ZWEIG, M. H.; CAMPBELL, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 4, p. 561-577, 1993.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,....., permito a participação do meu animal no estudo denominado Real Time PCR para diagnóstico de *Leishmania infantum* em cães de São Miguel do Oeste – SC. Os pesquisadores envolvidos me deram ciência que houve um aumento do número de casos de Leishmaniose visceral (LV) na região Sul do Brasil, da relevância da doença, a possibilidade de identificação e vigilância dos possíveis cães afetados e a falta de dados epidemiológicos referentes à leishmaniose visceral canina (LVC) na região do extremo-oeste de Santa Catarina.

A participação do meu animal no estudo será no sentido de serem observadas algumas características típicas da doença, como emagrecimento, crescimento exagerado das unhas, lesões ou feridas na pele, ainda será necessário coletar sangue do animal para pesquisa da doença no material biológico colhido.

Fui alertado de que a pesquisa poderá trazer alguns benefícios, tais como informações importantes sobre a identificação de LVC no extremo-oeste de Santa Catarina, resultando em dados importantes para a epidemiologia futura da doença nessa localidade.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo para o meu animal. A participação nesta pesquisa não traz complicações legais, não sendo observados riscos ao animal, apenas algum desconforto no momento da coleta sanguínea. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Lei Federal 11794, de 08 de outubro de 2008 e à Lei Estadual 11977, de 25 de agosto de 2008.

Estou ciente de que o meu animal será atendido, respeitado e receberá os cuidados necessários, como qualquer outro elemento submetido da mesma forma a procedimentos onde não estejam sendo utilizados para fins de pesquisa.

Também fui informado de que posso recusar que meu animal participe do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, do porque desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência do meu animal.

Estou ciente de que não terei nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago pela participação no meu animal.

As pesquisadoras envolvidas com o referido projeto são Nelí Maziero e Vanete Thomaz Soccol, ambas, vinculadas à Universidade Positivo, e com elas poderei manter contato pelos telefones (49) 99986256 e (41)99565001.

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas conseqüências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da participação da pesquisa com o meu animal.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor do projeto e compreendido a natureza e o objetivo do referido estudo, manifesto meu livre consentimento em permitir a participação do meu animal.

São Miguel do Oeste,

Nome e assinatura do proprietário do animal da pesquisa

Nome(s) e assinatura(s) do(s) pesquisador(es) responsável(responsáveis)

## ANEXO 2

### PROTOCOLO: Preparo dos meios de cultivo

#### a) Meio NNN (Novy-McNeal-Nicolle)

<u>Reagente</u>	<u>Quantidade</u>
Bacto agar	6,25 g
NaCl	3,75 g
Água destilada	1000 mL
Sangue de coelho	10 %

Preparo: Diluir o sal e o agar em água destilada e aquecer em banho-maria, manter em ebulição durante cinco minutos, sob agitação. Distribuir em frascos erlenmeyer, fechados e autoclavar por 15 minutos a 121 °C. Em cabine de fluxo laminar adicionar o sangue de coelho (10%) ao meio resfriado a 50°C, homogeneizar. Deixar solidificar em temperatura ambiente por duas horas. Manter o meio sob refrigeração a 4°C até seu uso.

O sangue de coelho é obtido por punção cardíaca e colocado em frasco erlenmeyer cotendo citrato de sódio a 10% (como conservante e anticoagulante).

#### b) Meio CCS (Coração-Cérebro-Sangue)

<u>Reagente</u>	<u>Quantidade</u>
Brain Heart Infusion Agar	52 g
Água destilada	1000 mL
Sangue de coelho	10%

Preparo: Em um recipiente de vidro é colocado os reagentes e em seguida o meio é diluído em água destilada e levado ao fogo em banho-maria até a fusão do agar. Os passos seguintes são idênticos aos descritos no preparo do meio NNN.

#### c) Solução tampão fosfato (PBS-Phosphate Buffered Solution)

<u>Reagente</u>	<u>Quantidade</u>
NaCl	8,77 g
Na <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	1,92 g
Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,39 g
Água destilada	1000 mL

Preparo: Hidratar os sais e homogeneizar a solução em agitador magnético até a sua completa dissolução. Ajustar o pH para 7,2 e esterilizar por filtração.

### ANEXO 3

#### PROTOCOLO: Produção de antígeno para o teste ELISA

O preparo dos antígenos seguiu os protocolos conforme Castro, Thomaz-Soccol, Augur (2003) e Szargiki *et al.* (2009).

a) Promastigotas de cepas referência de *Leishmania infantum* (MHOM/FR/71/LRM75), foram cultivadas em meio de crescimento bifásico NNN (Novy-McNeal-Nicolle) e mantidas em estufa a 24°C e repicadas a cada sete dias.

b) Após multiplicação as formas promastigotas foram recolhidas da fase exponencial de crescimento e lavadas com salina esterilizada (0,9% e 0,3%) e PBS pH 7.2 e recuperadas por centrifugação a 4°C.

c) Em seguida foram suspensas até obter concentração de  $10^7$  promastigotas/mL.

d) Contagem de promastigotas:

- De uma alíquota do concentrado, foi preparada uma diluição 1/10 com solução PBS pH 7,2. Em Câmara de Neubauer depositou-se 20  $\mu$ L desta suspensão diluída 1/10 em formol 2%.

- Para a obtenção do número de parasitas por mililitro de antígeno, foram contados os quatro quadrantes externos fazendo uma média, multiplicando o valor por 10.000 e pelo fator de diluição (10). A diluição final foi ajustada de modo a obter-se um número ideal de promastigotas, em torno de  $10^7$  mL.

## ANEXO 4

### PROTOCOLO: Produção de antígeno para RIFI

O preparo dos antígenos seguiu os protocolos conforme Castro 2001, com adaptações.

Formas promastigota de *L. infantum* foram cultivadas a 24 °C por sete dias em meio nutritivo CCS (Coração-Cérebro-Sangue).

a) Recolher a fase líquida do cultivo e filtrar em gaze esterilizada lavando com solução salina fisiológica a 0,85%, para eliminar restos de meio. Centrifugar por 20 minutos em centrífuga a 4°C.

b) Desprezar o sobrenadante e lavar com solução salina (sucessivamente 0,3% e 0,85%) até a lise das hemáceas e remoção da hemoglobina de coelho.

c) Lavar duas vezes com Solução PBS pH 7.2 e centrifugar em centrífuga refrigerada por 20 minutos.

d) Acrescentar ao sedimento, 10 mL de PBS pH 7.2. Para inativação dos protozoários e como forma de conservação, a ressuspensão foi mergulhada em banho-maria a 55°C por oito minutos.

e) Contagem de promastigotas:

- De uma alíquota do concentrado, foi preparada uma diluição 1/10 com solução PBS pH 7.2. Em Câmara de Neubauer depositou-se 20 µL desta suspensão diluída 1/10 em formol 2%.

- Para a obtenção do número de parasitas por mililitro de antígeno, foram contados os quatro quadrantes externos fazendo uma média, multiplicando o valor por 10.000 e pelo fator de diluição (10). A diluição final foi ajustada de modo a obter-se um número ideal de promastigotas, em torno de  $10^7$  mL.

## ANEXO 5

### PROTÓCOLO: Reação de Imunofluorescência Indireta

#### Preparo das lâminas:

Sensibilizar a lâmina com antígeno (20 µL/poço);

Deixar sedimentar por 15 minutos;

Armazenar a lâmina em estufa a 37 °C por 1 a 2h;

Guardar as lâminas prontas em caixas de vidro apropriadas e envolvê-las em papel de alumínio.

Armazenar em freezer (-20 °C) até sua utilização.

#### Procedimento:

- a) Retirar as lâminas do freezer; e secar com auxílio de ventilador;
  - b) Diluir os soros em solução PBS pH 7.2;
  - c) Adicionar 10 uL de cada diluição dos soros, e dos controles, na lâmina, registrando a posição de cada uma conforme a marcação na lâmina;
  - d) Colocar a lâmina em câmara úmida e incubar a 37 °C por 60 min.;
  - e) Depositar as lâminas, em posição vertical, em 3 banhos de PBS por 10 min.;
  - f) Enxaguar com água destilada;
  - g) Secar com auxílio de ventilador;
  - h) Fazer uma solução de PBSAE (PBS – Azul de Evans) 0,004%
  - i) Colocar 10 uL do conjugado (diluído em PBSAE) em cada poço
  - j) Repetir os passos d, e, f, g;
  - k) Depositar solução de glicerina 10% sobre as lâminas,
  - l) Cobrir com lamínula (mantendo sob abrigo de luz e umidade até a leitura).
- Leitura em microscópio para imunofluorescência (lâmpada HBO 200 e filtro BG 12) em aumento de 400x.

## ANEXO 6

### PROTOCOLO: Soluções para o teste Ensaio Imunoenzimático

a) Coating Buffer (tampão carbonato 0,005M)

Solução I:

<u>Reagente</u>	<u>Quantidade</u>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,1 g
Água deionizada	200 mL

Solução II:

<u>Reagente</u>	<u>Quantidade</u>
Na HCO <sub>3</sub>	4,2 g
Água deionizada	1000 mL

Acertar pH para 9.6 adicionando a solução A em B

b) Solução de Lavagem

<u>Reagente</u>	<u>Quantidade</u>
NaCl	9 g
Tween 20	0,5 mL
Água destilada	1000 mL

c) Solução de Bloqueio da placa

Caseína 2% em PBS\* (dissolver com aquecimento)  
0,05% de Tween 20

d) PBS 0,05M com 0,15M de NaCl, pH 7,4\*

Solução I:

<u>Reagente</u>	<u>Quantidade</u>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	7,1 g
NaCl	8,8 g
Água destilada	1000 mL

Solução II:

<u>Reagente</u>	<u>Quantidade</u>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 g
NaCl	1,88 g
Água destilada	200 mL

Acertar o pH para 7.4 adicionando a solução B em A.

e) Tampão de incubação (à partir da solução de Bloqueio)

<u>Reagente</u>	<u>Quantidade</u>
Solução de bloqueio	62,5 mL
Tween 20	0,25 mL
PBS pH 7.4	500 mL

Aliquotar em volumes de 10 mL e congelar.

f) Tampão citrato pH 5.0

<u>Reagente</u>	<u>Quantidade</u>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ou 13,4g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	7,10 g
Ácido cítrico	5,19 g
Água destilada	1000 mL

g) Solução de ácido sulfúrico a 2%

<u>Reagente</u>	<u>Quantidade</u>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	19 mL
Água destilada	41 mL

## ANEXO 7

### PROTOCOLO: Ensaio Imunoenzimático

#### Procedimento:

##### a) Sensibilização da placa:

- Diluir o antígeno na concentração desejada em *coating buffer*.
- Sensibilizar a placa de microtitulação por pipetar 100 µL da solução do antígeno em cada cavidade da placa;
- Cobrir a placa e incubar *overnight* a 4 °C.

##### b) Bloqueio:

- Remover a solução de antígeno e lavar a placa 2 vezes com solução de lavagem
- Aplicar a solução de bloqueio em toda a placa
- Cobrir e incubar por uma hora a 37 °C;
- Lavar 2 vezes com a solução de lavagem para retirada da proteína que não fixou.

##### c) Adição dos soros:

- As amostras de soros são descongeladas e diluídas em solução tampão de incubação à temperatura ambiente;
- Adicionar à placa 100 µL, conforme padronização;
- Cobrir e incubar a 37 °C por uma hora.
- Remover a solução de anticorpo e lavar a placa 4 vezes com solução de lavagem.

##### d) Adição do Conjugado:

- Diluir o conjugado em solução tampão de incubação em temperatura ambiente.
- Adicionar em toda a placa (exceto a coluna controle),
- Cobrir e incubar a 37 °C por uma hora.
- Em seguida, lavar 4 vezes com a solução de lavagem para remoção das partículas não ligadas.

##### e) Substrato:

- As pastilhas de OPD são diluídas em tampão citrato, no momento do uso e ao abrigo da luz.
- Em seguida adiciona-se 2 µL de peróxido de hidrogênio a 30%.

- O substrato é aplicado na placa toda;
- Incubar por 15 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente.

f) Interrupção da reação:

- Adicionar cuidadosamente 20  $\mu$ L/poço de uma solução de ácido sulfúrico a 2%, em toda a placa.

g) Leitura

- A placa é imediatamente levada ao Leitor de ELISA, onde é feita a leitura do espectro de cor, com ajuste para comprimento de onda de 492 nm.
- Os resultados são anotados em protocolo para posterior análise.

## ANEXO 8

### **PROTOCOLO: Técnica de extração de DNA de sangue pelo método de fenolclorofórmio, adaptado de Sambrook e Russel (2001).**

1. De 500  $\mu\text{L}$  de sangue foi extraído o DNA, adicionados 500  $\mu\text{L}$  de TE Tris-HCl 10 Mm, EDTA 1.0 Mm, pH 8.0) e centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos.
2. No material precipitado, adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  de tampão de Lise (Tris-HCl 10 Mm, EDTA 1.0 Mm pH 8.0), 100  $\mu\text{L}$  de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 5% e 10  $\mu\text{L}$  de proteinase K (20 mg.mL<sup>-1</sup>).
3. Após agitação, a mistura foi incubada a 56 °C por 5 horas e, logo após ocorreu a inativação da proteinase por 5 minutos a 90 °C, bem como adição de 5  $\mu\text{L}$  de RNase, incubando em banho-maria por mais 1 hora e 30 minutos à 37 °C.
4. Em seguida, adicionou-se uma solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e também clorofórmio puro.
5. Por conseguinte, o material lisado foi precipitado com acetato de sódio 3M 10% e álcool etílico absoluto gelado.
6. Seguiu-se com centrifugação da amostra, recuperando e lavando o precipitado com 300  $\mu\text{L}$  de etanol 70%.
7. O DNA foi precipitado novamente e secado em estufa a 37 °C até secarem por completo.
8. O DNA obtido foi ressuspenso em 100  $\mu\text{L}$  de tampão TE (Tris-HCl 10 Mm, EDTA 1.0 Mm, pH 8.0), permanecendo a 4 °C *overnight*.
9. Após foram feitas alíquotas para as análises, sendo que o restante foi mantido a -80 °C como solução estoque.

## ANEXO 9

### PROTOCOLO: Eletroforese em Gel de Agarose

#### Montagem do aparato de eletroforese:

1. Em bancada, colocar a cuba de eletroforese contendo suporte para verter o gel, pentes e dispositivo delimitador de suporte, fonte de energia e fios de corrente;
1. Conectar os fios de corrente a fonte;
2. Colocar os dispositivos delimitadores da bandeja;
3. Colocar o pente.

#### Preparo do gel de agarose:

1. Para detecção de produtos de PCR utilizar agarose a 1,5%. A cuba para eletroforese empregada comporta um volume de 30 ml de solução e para preparar um gel 1,5%, deve-se pesar 0,45 g de agarose;
2. Medir em proveta 30 ml de TAE 1X;
3. Transferir a agarose para erlenmeyer e verter o conteúdo da proveta para o erlenmeyer;
4. Agitar a mistura e dissolver em microondas até fusão da agarose.

#### Preparo da cuba de eletroforese com o gel de agarose e corrida:

1. Deixar esfriar a solução de agarose até 55 °C;
2. Deixar a solução solidificar;
3. Colocar o tampão de eletroforese apenas o suficiente para cobrir o gel;
4. Remover o pente;
5. Sobre um pedaço de parafilme, misturar as amostras como 0,2 volumes de tampão de amostra;
6. Aplicar a mistura para dentro da canaleta;
7. Após aplicação das amostras, fechar a tampa da cuba e conectar a ela os fios de corrente;
1. Ligar a fonte na voltagem desejada, neste caso 60 V. O DNA irá migrar para o pólo positivo (ânodo), indicado pela cor vermelha.

Coloração de DNA em gel de agarose:

1. Colocar o gel em recipiente contendo brometo de etídio a 0,5 mg/mL em suficiente quantidade para cobrir o gel por 20 minutos em temperatura ambiente;
2. Transferir o gel para recipiente contendo água destilada por aproximadamente 2 minutos;
2. Visualizar o gel sob luz ultravioleta;
3. Fotografar o gel.

## APÊNDICES

## APÊNDICE 1

Tabela 1. Cães amostrados da região do extremo-oeste de Santa Catarina

Nº	SEXO	ELISA	RIFI	PCR
1	M	0,080	1:40	P
2	F	0,481	-	N
3	M	0,140	-	N
4	F	0,096	-	N
5	M	0,078	-	N
6	F	0,102	-	N
7	F	0,132	1:40	P
8	F	0,270	1:40	P
9	M	0,206	-	N
10	F	0,112	-	N
11	F	0,164	-	N
12	F	0,056	-	N
13	M	0,168	-	N
14	M	0,143	-	N
15	M	0,181	-	N
16	M	0,099	-	N
17	M	0,166	-	N
18	M	0,151	-	N
19	F	0,203	-	N
20	F	0,200	-	N
21	M	0,177	-	N
22	M	0,201	-	N
23	F	0,336	1:40	P
24	M	0,089	-	N
25	F	0,109	-	N
26	F	0,086	-	N
27	M	0,121	-	N
28	M	0,085	-	N
29	M	0,080	-	N
30	M	0,100	-	N
31	F	0,148	-	N
32	M	0,204	1:40	P
33	F	0,136	-	N
34	F	0,165	-	P
35	M	0,125	-	N
36	M	0,307	1:40	P
37	M	0,132	-	P
38	M	0,100	-	N

**Tabela 1. Cães amostrados da região do extremo-oeste de Santa Catarina –  
continuação**

<b>Nº</b>	<b>SEXO</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>PCR</b>
39	M	0,108	1:40	P
40	M	0,131	-	N
41	M	0,208	-	N
42	F	0,115	-	N
43	F	0,093	-	N
44	M	0,114	-	N
45	F	0,130	-	N
46	M	0,185	-	N
47	F	0,251	1:40	P
48	F	0,098	-	N
49	M	0,202	-	N
50	F	0,204	-	N
51	F	0,161	-	N
52	F	0,208	-	N
53	M	0,203	-	N
54	F	0,102	-	N
55	M	0,309	1:40	P
56	M	0,111	-	N
57	M	0,187	1:40	P
58	M	0,243	-	N
59	F	0,530	1:40	P
60	F	0,141	-	N
61	M	0,204	-	N
62	M	0,818	1:40	P
63	F	0,201	-	N
64	F	0,204	-	N
65	F	0,177	-	N
66	F	0,126	-	N
67	F	0,135	-	N
68	F	0,299	-	N
69	F	0,207	-	N
70	M	0,201	-	N
71	F	0,372	1:40	P
72	F	0,207	-	N
73	F	0,176	-	N
74	M	0,566	1:40	P
75	M	0,558	1:40	P
76	F	0,164	-	N
77	M	0,208	-	N
78	M	0,172	-	N
79	F	0,184	-	N

**Tabela 1. Cães amostrados da região do extremo-oeste de Santa Catarina –  
continuação**

<b>Nº</b>	<b>SEXO</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>PCR</b>
80	M	0,251	1:40	P
81	F	0,656	1:40	P
82	M	0,198	-	N
83	F	0,207	-	N
84	M	0,157	-	N
85	M	0,198	-	N
86	M	0,486	1:40	P
87	M	0,199	-	N
88	F	0,204	-	N
89	F	0,153	-	N
90	M	0,107	-	N
91	F	0,588	1:40	P
92	M	0,181	-	N
93	M	0,113	-	N
94	M	0,178	-	N
95	M	0,179	-	N
96	M	0,201	-	N
97	M	0,117	-	N
98	F	0,147	-	N
99	F	0,191	-	N
100	M	0,207	-	N
101	M	0,247	-	N
102	M	0,111	-	N
103	M	0,207	-	N
104	M	0,188	-	N
105	M	0,174	-	N
106	M	0,334	-	N
107	F	0,209	-	N
108	M	0,113	-	N
109	F	0,209	-	N
110	F	0,146	-	N
111	M	0,094	-	N
112	M	0,200	-	N
113	M	0,136	-	N
114	M	0,155	-	N
115	F	0,140	-	N
116	F	0,203	-	N
117	M	0,823	1:40	P
118	F	0,202	-	N
119	F	0,200	-	N

**Tabela 1. Cães amostrados da região do extremo-oeste de Santa Catarina –  
continuação**

<b>Nº</b>	<b>SEXO</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>PCR</b>
120	M	0,145	-	N
121	F	0,123	-	N
122	F	0,350	1:40	P
123	M	0,191	1:40	P
124	F	0,178	-	N
125	F	0,181	-	N
126	F	0,143	-	N
127	F	0,117	-	N
128	M	0,113	-	N
129	M	0,195	1:40	P
130	F	0,394	1:40	P
131	F	0,352	1:40	P
132	M	0,195	-	N
133	M	0,195	-	N
134	M	0,203	1:40	P
135	F	0,258	1:40	P
136	F	0,122	1:40	P
137	M	0,241	1:40	P
138	M	0,119	-	N
139	M	0,161	-	N
140	M	0,191	-	N
141	M	0,169	-	N
142	F	0,189	-	N
143	M	0,172	-	N
144	F	0,207	-	N
145	M	0,209	-	N
146	M	0,172	-	N
147	F	0,800	1:40	P
148	F	0,200	-	N
149	M	0,172	-	N
150	M	0,189	-	N
151	M	0,209	-	N
152	M	0,183	-	N
153	M	0,163	-	N
154	M	0,201	-	N
155	M	0,209	-	N
156	M	0,129	-	N
157	F	0,144	-	N
158	F	0,194	-	N
159	F	0,133	-	N

**Tabela 1. Cães amostrados da região do extremo-oeste de Santa Catarina –  
continuação**

<b>Nº</b>	<b>SEXO</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>PCR</b>
160	F	0,191	-	N
161	F	0,184	-	N
162	M	0,762	-	P
163	F	0,452	-	N
164	F	0,230	-	N
165	M	0,514	-	N
166	M	0,555	1:40	P
167	M	0,339	-	N
168	M	0,616	1:40	P
169	F	0,476	-	P
170	F	0,519	1:40	P
171	M	0,201	-	N
172	M	0,137	-	N
173	M	0,189	-	N
174	M	0,134	-	N
175	M	0,207	-	N
176	M	0,125	-	N
177	M	0,198	-	N
178	M	0,511	-	P
179	F	0,131	-	N
180	M	0,244	-	N
181	M	0,198	-	N
182	F	0,164	-	N
183	F	0,557	1:40	P
184	M	0,197	-	N
185	F	0,198	-	N
186	M	0,144	-	N
187	M	0,112	-	N
188	M	0,127	-	N
189	M	0,247	-	N
190	M	0,162	-	N
191	M	0,203	-	N
192	M	0,217	-	N
193	M	0,137	-	N
194	M	0,178	-	N
195	M	0,190	-	N
196	M	0,325	1:40	P
197	M	0,209	-	N
198	F	0,161	-	N
199	M	0,070	-	N

**Tabela 1. Cães amostrados da região do extremo-oeste de Santa Catarina –  
continuação**

<b>Nº</b>	<b>SEXO</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>PCR</b>
200	F	0,096	-	N
201	F	0,113	-	N
202	F	0,125	-	N
203	M	0,123	-	N
204	M	0,131	-	N
205	M	0,099	-	N
206	M	0,123	-	N
207	M	0,137	-	N
208	M	0,178	-	N
209	M	0,136	-	N
210	M	0,093	-	N
211	M	0,079	-	N
212	M	0,158	-	N
213	M	0,110	-	N
214	M	0,102	-	N
215	M	0,077	-	N
216	M	0,085	-	N
217	F	0,128	-	N
218	F	0,164	-	N
219	M	0,160	-	N
220	M	0,171	-	N
221	M	0,108	-	N
222	M	0,147	-	N
223	M	0,149	-	N
224	M	0,144	-	N
225	M	0,082	-	N
226	F	0,101	-	P
227	M	0,104	1:40	P
228	M	0,185	-	P
229	F	0,196	-	N
230	F	0,147	-	N
231	M	0,087	-	P
232	M	0,270	1:40	P
233	M	0,197	1:40	P
234	M	0,188	-	N
235	F	0,326	1:40	P
236	M	0,203	-	N
237	M	0,361	1:40	P
238	M	0,174	-	P
239	M	0,298	-	P

**Tabela 1. Cães amostrados da região do extremo-oeste de Santa Catarina –  
continuação**

<b>Nº</b>	<b>SEXO</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>PCR</b>
<b>240</b>	F	0,150	-	N
<b>241</b>	M	0,170	-	N
<b>242</b>	M	0,247	-	N
<b>243</b>	M	0,177	-	N
<b>244</b>	M	0,207	-	N
<b>245</b>	M	0,207	-	N
<b>246</b>	F	0,156	-	N
<b>247</b>	F	0,154	-	N
<b>248</b>	F	0,372	1:40	P
<b>249</b>	F	0,196	-	P
<b>250</b>	M	0,248	1:40	P
<b>251</b>	F	0,462	1:40	P
<b>252</b>	F	0,265	-	P

**APÊNDICE 2****QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO****1. IDENTIFICAÇÃO:**

Nome do proprietário:

Endereço:

Rua:

Bairro:

Cidade:

Fone: \_\_\_\_\_

**2. DADOS DA RESIDÊNCIA:****2.1 Local da residência:** 1. zona urbana 2. zona rural**2.2 Conhece mosquito palha ou birigui ou cangalhinha ou flebotomíneos?****2.3. Verificou presença de mosquito palha ou birigui?** 1. ausente 2. pouco 3. muito**2.4. Se existe quando começou a perceber a presença deles?****2.5. Faz algum tipo de controle:** 1. tela 2. repelente de contato 3. protetor "elétrico" outros:**2.6 Presença de bosques na residência ou próximo dela:** 1. sim  2. não Qual? 1. mata ciliar 2. mata nativa 3. reflorestamento outros:**2.7 Distância da moradia:** 1. até 300 m 2. de 300 a 500 m 3. mais de 500 m Área aproximada: \_\_\_\_\_ m<sup>2</sup>**2.8 Presença de outros animais:** 1. sim  2. não Quais? 1. macacos 2. equinos 3. muares 4. animais silvestres 5. gambá 6. ratazanas

- ( ) 7. camundongo  
 ( ) 8. ratos silvestres  
 ( ) outros:

**2.9 Presença de material orgânico no quintal:**

- ( ) 1. sim ( ) 2. não Qual?  
 ( ) 1. horta  
 ( ) 2. pomar  
 ( ) 3. jardim  
 ( ) 4. lixo  
 ( ) 5. folhas e frutos amontoados  
 ( ) 6. entulhos  
 ( ) outros:

**2.10 Destino do esgoto doméstico:**

- ( ) 1. rede pública  
 ( ) 2. fossa  
 ( ) 3. céu aberto  
 ( ) 4. rio/córregos

**2.11 Destino do lixo:**

- ( ) 1. coleta pública  
 ( ) 2. terreno baldio  
 ( ) 3. quintal  
 ( ) outros:

**2.12 Presença de depósitos de água:**

- ( ) 1. poças d'água  
 ( ) 2. várzea  
 ( ) 3. alagadiços  
 ( ) 4. vasilhames com água  
 ( ) 5. pneus com água  
 ( ) outros:

A área alagadiça demora para secar?

- ( ) 1. sim ( ) 2. não Quanto tempo?

**3. DADOS CLÍNICOS DO MORADOR**

**3.1** Já ouviram falar de leishmaniose visceral?

**3.2** Algum morador apresenta lesão ?

- ( ) 1. sim ( ) 2. não Quantos? Qual o tipo?  
 ( ) 1. Fígado aumentado  
 ( ) 2. Febre  
 ( ) 3. Emagrecimento rápido  
 ( ) outros:

Tem lesão de pele ulcerada?

Qual o local da lesão?

E quanto tempo tem a lesão?

Qual a característica da lesão?

Tem diagnóstico? ( ) 1. sim ( ) 2. não Qual?

Fez tratamento? ( ) 1. sim ( ) 2. não Qual?

**4. DADOS DO CÃO**

Nome do animal:

Raça:

Sexo:

Idade:

Peso:

Este cão veio ou esteve em outra cidade?

 1. sim  2. não Qual? Há quanto tempo?**4.1 Apresenta algum sinal clínico de doença?** 1. sim  2. não Qual? 1. febre 2. desidratação 3. prostração 4. diarreia 5. anorexia 6. perda de peso 7. unhas grandes 8. alterações de pele 9. linfadenopatia 10. aumento de gânglios outros:**4.2 Cão apresenta lesão de pele?** 1. Sim.  2. Não Quanto tempo?

Qual o tipo?

 1. ulcerada 2. nodular outros:

Qual o local da lesão:

 1. orelha 2. bolsa escrotal 3. focinho 4. perivulvar 5. perianal 6. membros 7. abdômen outros locais:

Característica da lesão:

Tem diagnóstico?  1. sim  2. não Qual?Fez tratamento?  1. sim  2. não Qual?

Quanto tempo?

**Data da coleta:****Material:**  sangue  punção  esfregaço  outro:

ELISA:

 1. Reagente 2. Não reagente

PCR:

 1. Positivo 2. Negativo

RIFI:

 1. Reagente título: 2. Não reagente

**APÊNDICE 3**

**ARTIGO PUBLICADO**

**Rural–urban focus of canine visceral leishmaniosis in the far western region of  
Santa Catarina State, Brazil**



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Veterinary Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)



# Rural–urban focus of canine visceral leishmaniosis in the far western region of Santa Catarina State, Brazil

Nelí Maziero<sup>a</sup>, Vanete Thomaz-Soccol<sup>a,\*</sup>, Mário Steindel<sup>b</sup>, Juliana Seger Link<sup>c</sup>,  
Diego Rossini<sup>d</sup>, Silvana M. Alban<sup>a</sup>, Aguinaldo J. Nascimento<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Programa de pós graduação em engenharia de bioprocessos e biotecnologia, Universidade Federal do Parana, Curitiba, PR, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de microbiologia, imunologia e parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

<sup>c</sup> Programa de pós graduação em microbiologia, parasitologia e patologia, Universidade Federal do Parana, Curitiba, PR, Brasil

<sup>d</sup> Clínica Veterinária e Pet Shop Canis e Felis, São Miguel do Oeste, SC, Brasil

<sup>e</sup> Programa de pós graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Parana, Curitiba, PR, Brasil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 March 2014

Received in revised form 4 June 2014

Accepted 4 June 2014

#### Keywords:

*Leishmania infantum*

Dogs

Diagnosis

Serology

PCR

### ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the occurrence of canine visceral leishmaniosis (CVL) in the far western region of Santa Catarina State, bordering Argentina and Parana State, southern Brazil, where in recent years, VL has been recorded in both dogs and humans. Clinical signs, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) and polymerase chain reaction (PCR) were used for *Leishmania* investigation. Among the 252 dogs surveyed, 41 were positive by ELISA assay, 43 in IFAT (titer > 40), and 55 by PCR. From the 48 positive for VL by both serological and molecular methods, 19 (39.6%) presented clinical symptoms of leishmaniosis, 35 (72.9%) were from rural areas, and 13 (27.1%) were from urban areas. This pilot study confirms the occurrence of VL among dogs in the far western region of Santa Catarina, southern Brazil, with high risk of CVL outbreaks and presenting a threat to humans.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Short report

Visceral leishmaniosis (VL), caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* Nicolle 1908, is a chronic zoonosis in which domestic dogs are a known reservoir (Cortes et al., 2012). Several epidemiological studies have shown the growing spread of the disease worldwide and in Brazil (Solano-Gallego et al., 2001; Moreno and Alvar, 2002; Alvar et al., 2004; Maia-Elkhoury et al., 2008). According to the Brazilian Health Ministry, between 1980 and 2005, a total of 59,129 human cases were recorded and 82.5% of these occurred in the northeastern region. However, the parasite

gradually spread to other regions of the country, particularly to the States of Minas Gerais, São Paulo, and Mato Grosso (Maia-Elkhoury et al., 2008). More recently, outbreaks of CVL have been recorded in southern Brazil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, and Parana State), Paraguay, and principally in Argentina (Salomon et al., 2008; Cruz et al., 2010; Deboni et al., 2011; Dias et al., 2013; Steindel et al., 2013). It is important to highlight that hunting with dogs is a common practice in Argentina, which may be a triggering factor for disease outbreak, because the country has recorded outbreaks of CVL near the border of the states of Rio Grande do Sul and Paraná (Salomon et al., 2008; Cruz et al., 2010). Given this context, surveillance of CVL cases is important because canine infection precedes the disease in humans (Marzochi et al., 2009).

Thus, this study aimed to investigate VL occurrence among dogs in the far western region of Santa Catarina

\* Corresponding author. Tel.: +55 41 33613272/+55 41 33173483;  
fax: +55 41 33613272/+55 41 32662042.

E-mail address: [vanetesoccol@gmail.com](mailto:vanetesoccol@gmail.com) (V. Thomaz-Soccol).

State, Brazil. The study was conducted in the municipalities of São Miguel do Oeste and Descanso, latitude 26°43'31" and longitude 53°31'05". The climate is humid subtropical (Köppen-Geiger: Cfa; Peel et al., 2007) with an average annual temperature varying between 18 and 20 °C and annual mean rainfall varying from 2000 mm to 2400 mm (PDM, 2009).

The study was approved by the Animal Research Ethics Committee (CEUA) under protocol number 112/2012. The minimum number of sera was calculated assuming 5% prevalence, 95% confidence interval, and 5% precision (Thrusfield, 2004). The dogs used in the VL survey were randomly sampled in rural and urban areas.

Blood samples from 252 dogs were collected by jugular venipuncture, and sera were separated and stored at –20 °C until use. Identification data from dogs (name, breed, sex, age, origin, clinical history, and presence of clinical signs) as well as the presence of forest, sylvatic or domestic animals, organic matter, water reservoirs, and sewage and garbage near the dwelling were recorded.

Three different approaches were used for VL diagnosis: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect fluorescent antibody test (IFAT) and polymerase chain reaction (PCR).

Promastigotes of the reference strain *L. infantum* MHOM/FR/71/LRM75 grown at 24 °C in biphasic media brain–heart infusion broth (BHIB) were harvested from the exponential phase of growth and washed by centrifugation at 4 °C with sterile saline (0.9% and 0.3%) and PBS pH 7.2 and resuspended to a concentration of 10<sup>7</sup> promastigotes/mL. IFAT and ELISA antigen production processes were conducted as described by Castro et al. (2003) and Szargiki et al. (2009).

For ELISA, the sera samples were analyzed in 96-well flat-bottomed microtiter plates (high binding) sensitized with 500 ng/μL of protein diluted in coating buffer pH 9.6 and maintained overnight at 4 °C. After blocking with 2% casein in PBS, sera diluted 1:100 were added to each well and incubated at 37 °C for 1 h. The plates were then washed six times and incubated with rabbit peroxidase-conjugated 1:2500 anti-dog immunoglobulin G (IgG) antibody (Sigma). The reaction was revealed using hydrogen peroxide and ortho-phenylenediamine (OPD) and stopped with 20 μL of 2% sulfuric acid per well. Absorbance was determined in a spectrophotometer at 492 nm. A cutoff point for optimal sensitivity and specificity in ELISA tests was determined using receiver operating characteristic (ROC) curve analysis (Metz, 1978; Zweig and Campbell, 1993). The statistical analyses were performed using MedCalc Statistical Software (version 13.2.0).

For the IFAT assay, standardization of the technique was achieved with progressive dilutions of positive and negative control serum (1:20 to 1:320) against progressive dilutions of the conjugate (1:50 to 1:200), on five slides. The serum samples were screened in 1:40 dilution. The reactive sera were serially titrated up to a 1:640 dilution. The IgG conjugate (fluorescein isothiocyanate - Sigma) was used at 1:150 dilutions in 10% Evans Blue, from the previous titration. Each series of serum samples was run with positive and negative controls. The slides were analyzed

using fluorescence microscopy (HBO 200 bulb and BG 12 filter).

DNA was extracted from the leukocyte layer of blood using the standard phenol–chloroform method (Sambrook and Russel, 2001). After ethanol precipitation, DNA was resuspended in 50 μL ultra-pure water, incubated with RNase A (10 mg/mL) at 37 °C for 1 h, and stored at –20 °C until PCR realization. To amplify the 145 pb of the conserved region of the *L. infantum* DNA fragment, the primers RV1F and RV2R were used (Lachaud et al., 2002). The PCR was performed at a final volume of 25 μL containing 5 μL of DNA, 1 × buffer, 0.2 mM dNTPs, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.16 pmol of each primer (F and R), 2 U Taq polymerase (Invitrogen), and water up to the final volume. The reaction condition consisted of an initial denaturation at 94 °C for 5 min. This was followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 59 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s and a final extension at 72 °C for 10 min. PCR product was analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV. *L. infantum* DNA was used as a positive control, and DNA from uninfected dogs, as well as the addition of no DNA, were used as negative controls of the assay. All DNA extraction procedures were performed in separate rooms to prevent contamination.

Prevalence was calculated according to the formula: number of positive dogs/sampled population. The Chi square test ( $\chi^2$ ) was used to compare prevalence rates among sex, age, breed, clinical signs, and place of origin. A *p* value of  $\leq 0.05$  was the criterion for significance.

Among the 252 dogs investigated, 74.7% were from rural areas with forests close to the home, the presence of other mammals (opossums, rodents, horses and donkeys), and, in most cases, the presence of organic matter in the peridomestic area or close by. Concerning the canine population studied, 82.5% had no definite breed, 59.5% were male, 74.5% were aged 2 to 6 years old, and 86.5% were native to the region and had not been in another state for at least two years (Table 1). A statistically significant difference was observed, with a greater number of positive dogs among deer–hound breeds and those aged 7 to 10 years old ( $p \leq 0.05$ ). This indicates that deer–hound breeds, known for hunting activity, are more susceptible to exposure to the vector because they live in woods and forests. More positive results among older dogs indicate a greater period at risk of being bitten and decreased immunity, which increases the chances of acquiring the disease.

For the ELISA method, the diagnostic performance was sensitivity of 100% (CI95%: 91.4–100%), specificity of 99.3% (CI95%: 97.4–99.9), area under the ROC curve (AUC): 0.999, Youden index: 0.993,  $p < 0.0001$ , likelihood ratio of a positive test (LR+): 135 and a negative (LR–): 0. Of the total serum samples surveyed, 41/252 were positive. Forty-three dogs were positive by IFAT assay, with 43 showing titers of 1/40, 33 with 1:80 and 25  $\geq$  1:160. Fifty-five dogs were positive by PCR, 63.6% were asymptomatic (Table 2). Forty-eight dogs were positive for VL by both serological and molecular methods. The remaining 197 dogs were negative. Data analysis revealed that positive diagnosis was statistically associated with the symptomatology, breed, and age ( $p \leq 0.05$ ) of the dogs.

**Table 1**  
Epidemiological data and characteristics of the dogs studied.

Environmental conditions	Number (%) total residences	Number (%) positive dogs
Location of residence		
Rural area	56 (74.7)	35 (72.9)
Urban area	19 (25.3)	13 (27.1)
Presence of forest close to the residence		
Riparian forest	5 (6.7)	1 (2.1)
Native forest	37 (49.3)	25 (52.1)
Reforestation	15 (20.0)	12 (25.0)
Reforestation + native forest	14 (18.7)	10 (20.8)
No forests	4 (5.3)	0 (0.0)
Presence of forest within 300 m of the residence		
Presence	27 (36.0)	17 (35.4)
Absence	48 (64.0)	31 (64.6)
Presence of other animals		
Presence	71 (94.7)	48 (100.0)
Absence	4 (5.3)	0 (0.0)
Presence of organic matter in the yard		
Presence	73 (97.3)	48 (100.0)
Absence	2 (2.7)	0 (0.0)
Dog characteristics	Number (%)	
Breed		
No defined breed	208 (82.5)	35 (72.9)
Fila Brasileiro	17 (6.7)	0 (0.0)
Veadeiro Brasileiro	11 (4.4)	10 (20.8)
Others	16 (6.3)	3 (6.3)
Age		
Up to 1 year old	38 (15.1)	4 (8.3)
2 to 6 years old	188 (74.6)	23 (47.9)
7 to 10 years old	21 (8.3)	15 (31.3)
Over 10 years old	5 (2.0)	6 (12.5)
Sex		
Male	150 (59.5)	27 (56.3)
Female	102 (40.5)	21 (43.8)
Hunting dogs		
Yes	25 (9.9)	15 (31.2)
No	234 (90.1)	33 (68.8)

Among the 48 dogs positive by both serological and molecular methods, 19 (39.6%) presented clinical signs of VL. The most common clinical manifestations observed were skin alterations in 31.2% (alopecia, ulcerative lesions, and hyperkeratosis), weight loss (27.1%), onychogryphosis (25.0%), lymphadenopathy (20.8%), or anorexia (12.5%). Visceral leishmaniosis in dogs can exhibit a large spectrum of clinical presentations with variable degrees of severity

**Table 2**  
Number and percentage of dogs positive for visceral leishmaniosis following serological (IFAT and ELISA) and molecular (PCR) tests and relationship with clinical presentation.

Clinical form	Method	Number of positive dogs	% of positivity
Symptomatic	ELISA	19	46.4
	IFAT	17	39.6
	PCR	20	36.3
Asymptomatic	ELISA	22	53.6
	IFAT	26	60.4
	PCR	35	63.6

(Dantas-Torres, 2006; Rondon et al., 2008; Baneth et al., 2008; Cunha et al., 2012).

In our study, an average of 59.2% of positive dogs were asymptomatic (Table 2). These results were supported by other works (Dantas-Torres, 2006; Rondon et al., 2008; Cunha et al., 2012; Steindel et al., 2013), confirming that asymptomatic dogs act as parasite reservoirs, playing an important role in the maintenance of the parasite transmission cycle (Cardoso et al., 2012; Mohammadiha et al., 2013). The capacity to infect phlebotomines is higher for symptomatic (28%) than asymptomatic dogs (5.4%) (Michalsky et al., 2007). In a recent study in Florianopolis of 11 dogs with VL, 90.9%, including four asymptomatic dogs, presented high skin parasitism, as demonstrated by histopathology (Steindel et al., 2013). Therefore, under favorable conditions (higher sandfly density), asymptomatic dogs can contribute to parasite transmission, and the infection can spread and infect humans.

In summary, this work shows that of the 252 dogs investigated, 16.7% of them presented clinical signs of VL, 21% presented positive serology (ELISA + IFAT), and 21.8% were positive when tested by PCR. These results are supported by other studies in molecular epidemiology. For example, in Spain, 13% of dogs apparently presented clinical disease; 26% were seropositive and 63% were positive when PCR was used as a diagnostic technique (Solano-Gallego et al., 2001). In Greece, 12.3% of dogs presented anti-*Leishmania* antibodies and 63% were positive using the molecular technique (Leontides et al., 2002). This preliminary study confirms that the presence of CVL in the municipalities of São Miguel do Oeste and Descanso in the western region of Santa Catarina State means the occurrence of an outbreak is possible, as is the appearance of human cases in the future. The characteristics of the epidemiological cycle of VL in this region remain to be determined. A phylogeny study will provide important information regarding whether the parasite arrived in this region from neighboring Argentina or the States of Parana or Rio Grande do Sul.

### Acknowledgment

The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ - 307387/2011-9) for its financial support.

### References

- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1–88.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trend Parasitol.* 24, 324–330.
- Cunha, R.C., Andreotti, R., Silva, E.A., Pereira, E., Thomaz Soccol, V., 2012. Laboratory diagnosis and clinical signs of canine visceral leishmaniasis in dogs examined at the center for zoonosis control in Campo Grande—MS. *Braz. Arch. Vet. Sci.* 17, 17–26.
- Cardoso, L., Mendão, C., Carvalho, L.M., 2012. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal—a national serological study. *Parasites Vectors* 5, 62.
- Castro, E.A., Thomaz-Soccol, V., Argur, C., 2003. Standardization of ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) and indirect fluorescent antibody test (IFAT) techniques for canine cutaneous leishmaniasis. In: Roussos, S., et al. (Eds.), *New Horizons in Biotechnology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherland, pp. 421–428 [S.I.].

- Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L., Campino, L., 2012. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Vet. Parasitol.* 189, 189–196.
- Cruz, I., Acosta, L., Gutiérrez, M.N., Nieto, J., Cañavate, C., Deschutter, J., Bornay-Llinares, F.J., 2010. A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina). *BMC Infect. Dis.* 10, 342.
- Dantas-Torres, F., 2006. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. *Rev. Saúde Pública* 40, 537–541.
- Deboni, S.C., Barbosa, M., Ramos, R.R., 2011. Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul. *Bolm. Epidemiol.* 13, 1–3.
- Dias, R.C.F., Thomaz Soccol, V., Bisetto Júnior, A., Pozzolo, E.M., Chiyo, L., Freire, R.L., Mitsuka, B.R., Pasquali, A.K.S., Alban, S., Fendrich, R.C., Caldart, E.T., Navarro, I.T., 2013. Occurrence of anti-*Leishmania* spp. Antibodies in domiciled dogs from the city of Foz do Iguaçu, state of Paraná, Brazil. In: *Fifth World Congress on Leishmaniasis, Paraná, Brazil*, pp. 826.
- Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P., Bastien, P., 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 210–215.
- Leontides, L.S., Saridomichelakis, M.N., Billinis, C., Kontos, V., Koutinas, A.F., Galatos, A.P., Mylonakis, M.E., 2002. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. Infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet. Parasitol.* 109, 19–27.
- Maia-Elkhoury, A.N.S., Alves, W.A., Sousa-Gomes, M., Sena, J., Lana, E., 2008. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad. Saúde Pública* 24, 2941–2947.
- Marzochi, M.C.A., Fagundes, A., Andrade, M.V., Souza, M.B., Madeira, M.F., Mouta-Confort, E., Schubach, A.O., Marzochi, K.B.F., 2009. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco epidemiological aspects and control. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42, 570–580.
- Metz, C.E., 1978. Basic principles of ROC analysis. *Semin. Nucl. Med.* 8, 283–289.
- Michalsky, E.M., Rocha, M.F., da Rocha Lima, A.C., França-Silva, J.C., Pires, M.Q., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., dos Santos, S.L., Barata, R.A., Romanha, A.J., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S., 2007. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.* 147, 67–76.
- Mohammadiha, A., Haghghi, A., Mohebbali, M., Mahdian, R., Abadi, A.R., Zarei, Z., Yeganeh, F., Kazemi, B., Taghipour, N., Akhoundi, B., Barati, M., Mahmoudi, M.R., 2013. Canine visceral leishmaniasis: a comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. *Vet. Parasitol.* 192, 83–90.
- Moreno, J., Alvar, J., 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 18, 399–405.
- PDM–São Miguel do Oeste, 2009. Plano Diretor Municipal. PDM–São Miguel do Oeste, São Miguel do Oeste, SC.
- Peel, M.C., Finlayson, B.L., McMahon, T.A., 2007. Updated world map of the Köppen–Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 11, 1633–1644.
- Rondon, F.C., Bevilacqua, C.M.L., Franke, C.R., Barros, R.S., Oliveira, F.R., Alcântara, A.C., Diniz, A.T., 2008. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 155, 24–31.
- Salomon, O.D., Sinagra, A., Nevot, M.C., Barberian, G., Paulin, P., Estevez, J.O., Riarte, A., Estevez, J., 2008. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 109–111.
- Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* 39, 560–563.
- Steindel, M., Menin, A., Evangelista, T., Stoco, P.H., Marlow, M.A., Fleith, R.C., Pilati, C., Grisard, E.C., 2013. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 33, 490–496.
- Szargiki, R., Castro, E.A., Luz, E., Kowalthuk, W., Machado, A.M., Thomaz Soccol, V., 2009. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Parana, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 13, 47–52.
- Thrusfield, M.V., 2004. *Epidemiologia Veterinária*, 2<sup>a</sup> 11d. Roca, São Paulo, 556 p.
- Zweig, M.H., Campbell, G., 1993. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* 39, 561–577.