

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA
CAMPUS ARAÇATUBA

**RELAÇÃO ENTRE PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-
Leishmania spp. E CARGA PARASITÁRIA EM SANGUE
DE CÃES DE ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE
VISCERAL**

Carolina Aparecida Carlin Beloti
Médica Veterinária

Araçatuba – SP
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA
CAMPUS ARAÇATUBA

**RELAÇÃO ENTRE PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-
Leishmania spp. E CARGA PARASITÁRIA EM SANGUE
DE CÃES DE ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE
VISCERAL**

Carolina Aparecida Carlin Beloti
Orientadora Professora Adjunto Cárís Maroni Nunes
Coorientador Prof. Dr. David Anthony Orin Courtenay

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Araçatuba – SP

2014

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Beloti, Carolina Aparecida Carlin

B452r

Relação entre presença de anticorpos anti-Leishmania spp. e carga parasitária em sangue de cães de área endêmica para Leishmaniose Visceral / Carolina Aparecida Carlin Beloti. -- Araçatuba: [s.n], 2014.

56 f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2014.

Orientador: Profa. Adj. Cárís Maroni Nunes

Coorientador: Prof. Dr. David Anthony Orin Courtenay

1. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. 2. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 3. Diagnóstico. 4. Teste rápido DPP® I. T.

CDD 636.089444


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Relação entre presença de anticorpos anti-Leishmania spp. e carga parasitária no sangue de cães de área endêmica para leishmaniose visceral.

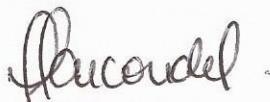
AUTORA: CAROLINA APARECIDA CARLIN BELOTI

ORIENTADORA: Dra. CÂRIS MARONI NUNES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.



Dra. MÁRCIA DALASTRA LAURENTI

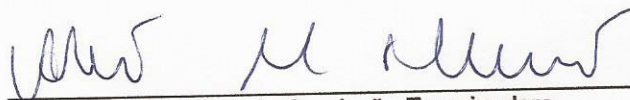


Dra. MARY MARCONDES



Dra. CÂRIS MARONI NUNES

DATA DA REALIZAÇÃO: 17 de julho de 2014.



Presidente da Comissão Examinadora

Dra. CÂRIS MARONI NUNES

- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CAROLINA APARECIDA CARLIN BELOTI – nascida na cidade de São José dos Campos - SP em 14 de julho de 1988. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Araçatuba, São Paulo, em dezembro de 2011. Realizou pesquisa em iniciação científica nas áreas de Parasitologia Veterinária no Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal (DAPSA), e de Anestesiologia Veterinária no Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal (DCCRA) na FMVA, UNESP, campus Araçatuba. Seu estágio curricular foi realizado no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da prefeitura municipal de Americana, São Paulo, na disciplina de Planejamento em Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu, São Paulo, e no Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP) em São Paulo. Publicou um artigo em revista científica internacional, apresentou três trabalhos em congressos nacionais, e dois em congressos internacionais. Exerceu atividade de coordenação do banco de dados e dos trabalhos de campo de pesquisa realizada em colaboração com as Universidades de Warwick e Keele, da Inglaterra.

“Não confunda derrotas com fracasso nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”

Roberto Shinyashiki

“Dedico este trabalho a minha querida família, pela dedicação e confiança que sempre depositaram em mim, e que sem o seu apoio e paciência, eu não conseguiria, em hipótese alguma, concluir mais esta etapa da minha vida.”

Agradecimentos

À minha querida família, minha mãe Carla, meu pai Adauto, minhas irmãs Amanda e Daniele, aos meus avós e à minha Tia Adenise. Por serem sempre a minha estrutura de apoio até chegar a esta vitória, pelo imenso carinho, dedicação, confiança e amor incondicional.

Aos amigos que sempre estiveram à disposição para estender as mãos em momentos de desespero, em especial Rafaela, Edivânia, Daiene, Bruna, Kleber, Yuri, Píer, Luis Henrique, Fernanda, Silvana, Dandara, Samuel, Igor, Leopoldo, Matheus, Carlos Alberto, Talita, Acácio, Augusto e Graziella. E aos demais amigos que batalharam junto a mim.

Aos doutores Suzanne Gookol, Erin Dilger e Orin Courtenay pelo apoio, ensinamentos e experiências compartilhadas.

À professora doutora Cárís Maroni Nunes pela oportunidade concedida, pela confiança, amizade, carinho, por ter sempre cuidado de mim não só no aspecto profissional, mas também pessoal, me “adotando” como filha, mas sem deixar de ensinar e cobrar, como um bom pai faz.

À Universidade Estadual Paulista, nas pessoas dos coordenadores de curso, chefes de departamento e outros representantes legais, pela receptividade, abertura e incentivo para os estudos.

A todos os professores que de maneira direta e indireta contribuíram neste período.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
AGENTE BIOLÓGICO	12
CICLO BIOLÓGICO.....	13
VETOR	13
RESERVATÓRIO	15
IMUNIDADE E DIAGNÓSTICO NO RESERVATÓRIO CANINO.....	15
VIGILÂNCIA E CONTROLE	18
OBJETIVO	20
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO 2 - PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-<i>Leishmania spp.</i> E CARGA PARASITÁRIA EM CÃES DE ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL	34
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS	37
ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM.....	37
COLETA DE DADOS	38
SINAIS CLÍNICOS.....	38
COLHEITA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	38
TESTE RÁPIDO DPP E EIE-ELISA BIOMANGUINHOS®	39
AMPLIFICAÇÃO DE kDNA POR PCR EM TEMPO REAL (qPCR).....	40
ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
COMITÊ DE ÉTICA	41
RESULTADOS	41
DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	49

RELAÇÃO ENTRE PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania spp.* E CARGA PARASITÁRIA EM CÃES DE ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO – As estratégias de controle da leishmaniose visceral (LV) no Brasil estão baseadas no diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, no controle dos vetores, através do uso de inseticidas e na triagem sorológica com posterior eutanásia de cães positivos para leishmaniose. Assim, o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) deve ser capaz de identificar adequadamente o reservatório canino, garantindo a eficiência desta medida de controle. Considerando-se que a resposta imune humoral desenvolvida por cães à infecção natural por *Leishmania spp.* é dependente da carga parasitária, o objetivo desta pesquisa foi avaliar se o resultado dos testes diagnósticos atualmente utilizados em inquéritos soro epidemiológicos no Brasil (teste rápido-DPP BioManguinhos[®] e teste ELISA indireto EIE-ELISA BioManguinhos[®]) apresentam relação com a carga parasitária do sangue de cães. Para tal foram avaliadas amostras de 610 cães da região noroeste do Estado de São Paulo a qual é endêmica para LV. A positividade variou de 15,9 a 68.4% acordo com as técnicas utilizadas, devido às diferenças na sensibilidade e especificidade dos testes. De modo geral, cães sorologicamente positivos apresentaram carga parasitária média maior que a dos cães negativos. Entretanto, a avaliação do potencial de transmissão dos cães sorologicamente negativos faz-se necessária.

Palavras-Chave: Diagnóstico, Teste rápido DPP[®], Ensaio de Imunoadsorção Enzimática, Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

RELATIONSHIP BETWEEN THE PRESENCE OF ANTI *Leishmania* spp. ANTIBODIES AND PARASITE LOAD IN DOGS FROM A VISCERAL LEISHMANIASIS ENDEMIC AREA

SUMMARY – Visceral leishmaniasis (VL) control strategies in Brazil are based on the early detection and treatment of the patients, vector control by insecticide and the serological screening and euthanasia of positive dogs. Thus, canine visceral leishmaniasis (CVL) diagnosis must accurately identify canine reservoir hosts to ensure the efficiency of screening. Considering that the humoral immune response of dogs to natural *Leishmania* spp. infection is dependent on parasite load, our aim was to evaluate if outcomes of the diagnostic kits currently used in canine seroepidemiological surveys in Brazil (DPP-BioManguinhos™ rapid test and EIA-ELISA Indirect ELISA BioManguinhos™) could be related to the blood parasite loads in dogs. Six hundred and 10 dogs from the VL endemic region of Northwest São Paulo State were sampled for this evaluation. Positivity varied from 15.9 to 68.4% between diagnostic techniques, due to differences in test sensitivity and specificity. Overall, positive dogs had higher mean parasite loads than negative dogs. Nevertheless, the potential of transmission of the negative dogs shall be investigated.

Key- words: Diagnosis, rapid test DPP™, Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Real-time polymerase chain Reaction.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A leishmaniose visceral (LV), doença crônica transmitida por vetor, potencialmente fatal se não tratada adequadamente, é considerada uma das doenças mais negligenciadas do mundo, ocorrendo principalmente em crianças, indivíduos subnutridos e pacientes imunocomprometidos de regiões pobres e subdesenvolvidas (BRASIL, 2006). Estima-se que 350 milhões de pessoas encontra-se em risco de contrair a doença e que 0,5 milhões de casos novos ocorrem anualmente no mundo, causando aproximadamente 50.000 mortes anualmente (WHO, 2010).

Mais de 90% dos casos de LV estão distribuídos em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul. Na América Latina há de 4.500 a 6.800 casos ao ano e a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que o Brasil representa 90% dos casos (ALVAR et al., 2012; BRASIL, 2006; TRAVI, 2014; WHO, 2010).

A leishmaniose visceral está distribuída em 21 dos 27 estados brasileiros, com aproximadamente 3.500 casos anuais e média de 277 óbitos a cada ano (MARTINS-MELO et al., 2014). Somente no Estado de São Paulo, em quatorze anos (de 1999 a maio de 2013) foram notificados 2.204 casos humanos da doença e 192 óbitos (SÃO PAULO, 2014).

Desde a década de 80, a LV vem passando por processo de expansão e urbanização, muitas vezes associada à migração de casos humanos e de cães infectados para cidades de grande e médio porte. Assim, o ciclo que fora antes basicamente de áreas rurais, assumiu um caráter adaptativo urbano (GONTIJO;MELO 2004; HARHAY et al., 2011).

AGENTE BIOLÓGICO

Esta zoonose é causada por espécies de protozoários *tripanossomatídeos* do gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*, sendo a espécie *Leishmania infantum chagasi* a mais comumente envolvida no Brasil (LAINSON; SHAW, 1987; GRAMICIA, 2011).

São parasitas intracelulares obrigatórios do sistema fagocítico mononuclear, assumindo forma amastigota, não flagelada, nos hospedeiros vertebrados e forma promastigota, flagelada, no tubo digestório do inseto vetor (BRASIL, 2006; CHANCE;EVANS 1999; SÃO PAULO, 2006; READY, 2014).

CICLO BIOLÓGICO

A *Leishmania spp.* perpetua seu ciclo ao vetor ao fazer o repasto em um animal infectado, ingerindo macrófagos contendo a forma amastigota. No tubo digestório do vetor esses macrófagos se rompem, liberando as formas amastigotas, as quais passam por diferentes estágios de diferenciação e multiplicação no intestino (anterior e médio) do flebotomíneo (promastigota procíclica, neptômonas, leptômonas, haptômonas e metacíclica, forma infectante) e migram em direção às peças bucais dos flebotomíneos (GOSSAGE et al., 2003, KAMHAWAI, 2006). Ao se alimentarem em um hospedeiro susceptível, essas formas promastigotas descem pela peça bucal e adentram na derme deste animal, são fagocitados pelos macrófagos onde, na forma amastigota, se multiplicam até romperem o macrófago, infectando então novos macrófagos, continuando assim sua multiplicação, até que um novo inseto vetor se alimente em hospedeiro infectado e os adquira, perpetuando assim o ciclo (CHANCE; EVANS 1999, GOSSAGE et al., 2003).

VETOR

A principal forma de transmissão do protozoário para os hospedeiros mamíferos se dá por meio da picada de fêmeas de dípteros da família *Psychodidae*, sub-família *Phlebotominae*, também chamados de flebotomíneos (KAMHAWAI, 2006; LAINSON; SHAW, 1987).

No Brasil a *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie transmissora da *Leishmania infantum chagasi*, todavia a *Lutzomyia cruzi* tem sido registrada como vetor em algumas regiões do país (BRASIL, 2006; BRAZIL, 2013; SANTOS et al., 1998).

Estes flebotomíneos possuem o corpo coberto por pelos de coloração amarelada ou cor de palha, são de tamanho pequeno (1 a 3 mm), possuem vôo de baixo alcance, em pequenos saltos e ao repousarem permanecem com as asas semi-abertas ou eretas, sendo por essas características conhecidos por mosquito palha, asa-dura, cangalhinha ou Birigui (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

O processo reprodutivo destes insetos passa por quatro fases e dura aproximadamente de 30 a 40 dias. Os ovos são depositados em ambientes úmidos, sombreados, ricos em matéria orgânica, serrapilheira, bases de árvores, fendas de rochas ou locais onde se abrigam animais (BRASIL, 2006; BRAZIL et al., 2003; CASANOVA et al., 2013; FELICIANGELI, 2004; KILLICK-KENDRICK, 1999; MAROLI et al., 1997; RUTLEDGE et al., 1975; SÃO PAULO, 2006). As formas adultas (aladas), geralmente se abrigam próximo aos locais onde se desenvolvem as fases imaturas ou no peridomicílio (SÃO PAULO, 2006), mas possuem preferência por abrigo de animais, especialmente galinheiros, tanto para reprodução (CASANOVA et al., 2013) quanto para permanência (BRAY et al., 2010; QUINNELL et al., 1994).

Machos e fêmeas necessitam de fontes de carboidratos para sua alimentação, porém as fêmeas obrigatoriamente apresentam hábito hematófago, pois necessitam de sangue para o desenvolvimento de seus ovos, alimentando-se de animais vertebrados “de sangue quente”, inclusive o homem (AFONSO et al., 2012; DIAS et al., 2003; MORRISON et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2008). Seu hábito alimentício é predominantemente noturno, tendo início aproximadamente uma hora após o pôr do sol (CAMARGO-NEVES, 2004).

A *Lutzomyia longipalpis* teve sua presença descrita pela primeira vez no Estado de São Paulo em 1970, em área rural, e em área urbana em 1997, na cidade de Araçatuba (COSTA et al., 1997). Desde então estes flebotomos vêm se disseminando pela região e se adaptando às áreas urbanas, resultando no processo de expansão da doença (DESJEUX, 2004; SÃO PAULO, 2006; GOMES et al., 2011).

RESERVATÓRIO

O cão doméstico tem sido considerado o reservatório de maior importância para a transmissão da LV ao homem, dada a alta prevalência da doença na população canina e seu estreito convívio com o homem. Outros reservatórios da doença como as raposas, marsupiais, roedores, edentados, procionídeos, primatas, felinos e morcegos têm sido relatados como reservatórios potenciais (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; DE OLIVEIRA, 2012; LAINSON; RANGEL, 2005; RICHARD; ASHFORD, 1996; WHO, 2010;).

Alguns autores levantam a hipótese da transmissão da doença entre os caninos através da picada ou ingestão de carrapatos infectados (COUTINHO et al., 2005; DANTAS TORRES et al., 2010), por mordedura (DUPREY et al., 2006), transmissão venérea (SILVA et al., 2009a), por transmissão vertical (SILVA et al., 2009b), entre outros, porém não se conhece a importância epidemiológica destes na transmissão da doença aos humanos.

IMUNIDADE E DIAGNÓSTICO NO RESERVATÓRIO CANINO

A infecção por *Leishmania infantum chagasi* em cães susceptíveis, geralmente leva à uma infecção de evolução crônica que nem sempre resulta no desenvolvimento de sinais (PALTRINIERI et al., 2010).

O sistema imune do cão infectado possui um papel fundamental para o desenvolvimento da doença, cães que apresentam resposta imune celular mais evidente e nenhuma, ou fraca resposta humoral, geralmente permanecem saudáveis, sem desenvolvimento de sinais. Já os que apresentam intensa atividade imune humoral e fraca ou nenhuma atividade celular apresentam-se intensamente enfermos (PINELLI et al., 1994).

Os sinais clínicos mais frequentes na leishmaniose visceral canina são: emagrecimento progressivo, evoluindo para caquexia, onicogribose, lesões cutâneas, alopecia, esplenomegalia, linfadenopatia, ceratoconjuntivite, diarreia, hemorragias, paresia e edema de membros posteriores (BRASIL, 2006, SOLANO-GALEGO et al., 2009).

O tempo de soroconversão, após infecção natural, em geral é maior quando comparado ao observado em infecção experimental. Em cães submetidos à infecção experimental, o tempo de soroconversão varia de 30 a 150-180 dias (MORENO;ALVAR, 2002), ao passo que em infecção natural este período pode durar de um mês a quatro anos (KEENAN et al., 1984; LANOTTE et al., 1979).

O diagnóstico clínico, isoladamente, não é recomendado no controle da enfermidade, pois de 40 a 60% dos cães soropositivos são assintomáticos (BRASIL, 2006) e mesmo sem sintomas clínicos podem apresentar grande quantidade de parasitos na pele, o que facilita a infecção do vetor (MONTEIRO et al., 1994).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por exames parasitológicos após punção aspirativa e esfregaço de medula óssea, linfonodo, baço, fígado, pele e sangue; por imunohistoquímica; pela detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania*, ou por exames moleculares como a amplificação de DNA pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) (LAURENTI, 2009; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009).

O exame parasitológico apresenta especificidade de 100% uma vez que se baseia na observação direta da forma amastigota do parasito, porém, a sensibilidade pode variar de 30 a 91%, dependendo do tipo de material colhido e do grau de parasitismo (FERRER, 1999; KOUTINAS et al., 2001). Portanto, em um animal assintomático, o diagnóstico se torna mais difícil e duvidoso, sendo baixo o valor preditivo negativo.

O teste ELISA pode apresentar sensibilidade variando entre 80% e 99,5% e especificidade entre 81% e 100%, dependendo do antígeno utilizado (MANCIANTI et al., 1995; 1996). A utilização de antígenos purificados ou recombinantes melhora a sensibilidade e especificidade desta técnica (COSTA et al., 1991; OZENZOY, 1998; SCALONE et al., 2002). Após o desenvolvimento do antígeno recombinante rK39 foi possível desenvolver testes rápidos para leishmaniose visceral que possuem um formato fácil e prático para se implementar em inquéritos caninos (GENARO et al.,1997;

METTLER et al., 2005; PATTABHI et al., 2010). O rK39 foi elaborado através de técnicas de clonagem e sua sequência codifica uma proteína imunodominante com epítipo repetitivo conservado entre as leishmanias do complexo *donovani*, mas especialmente entre a *Leishmania infantum chagasi* e *Leishmania donovani*, não apresentando reatividade cruzada com *Trypanosoma cruzi*. Assim, o antígeno recombinante rK39 apresenta grande especificidade e aplicabilidade no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral (BURNS et al., 1993)

O teste rápido com antígeno rK39 foi avaliado em cidades brasileiras endêmicas para leishmaniose, revelando sensibilidade de 92% e especificidade de 99,5% em cães (GENARO et al., 1997).

Embora o antígeno rK39 seja mais específico, resulta em baixa sensibilidade em animais em processo de cura ou recém infectados, possuindo assim maior sensibilidade em animais com doença ativa (BADARÓ et al., 1996). Para minimizar este fato, novo antígeno recombinante foi desenvolvido através da fusão de poliproteínas compreendendo regiões haspb1 (do inglês, *hydrophilic acylated surface protein b*) de *L. donovani* (homólogo da K26 de *L. infantum chagasi*), cinesina de *L. donovani* (homólogo da K39 de *L. infantum chagasi*) e toda a sequência haspb2 de *L. donovani* (homólogo da K9 de *L. infantum chagasi*). A partir deste novo antígeno, denominado rK28, foi criado um novo teste rápido, de dupla plataforma (DPP), mais sensível e específico do que o utilizado com antígeno rK39, devido ao fato de poder detectar anticorpos circulantes contra os três componentes do antígeno e gerando um sinal mais forte (PATTABHI et al., 2010).

Dentre os métodos diagnósticos moleculares para LV, a técnica de PCR convencional é uma técnica que, por amplificar exponencialmente o DNA do parasito, apresenta alta sensibilidade, mesmo se efetuado em amostras com baixa carga parasitária, sendo capaz de identificar o material genético do parasito nos cães antes mesmo da soroconversão (STRAUSS-AYALI et al., 2004). Já a PCR em tempo real (qPCR) apresenta a vantagem de ser mais sensível e rápida, além de permitir a quantificação da carga parasitária em

indivíduos infectados (FRANCINO et al., 2006; CARSON et al., 2010; RAMOS et al. 2012), uma problemática existente no controle desta doença, uma vez que a carga parasitária do animal pode influenciar a chance de transmissão do agente etiológico para o vetor (COURTENAY et al., 2002; MICHALSKY et al., 2007; SOARES et al., 2011) e, conseqüentemente, no risco para o ser humano.

Alguns estudos mostram que a carga parasitária pode variar de acordo com o tecido e tempo de evolução da doença no cão (MANNA et al., 2006; QUARESMA et al., 2009) mas pouco se conhece, por exemplo, sobre o papel dos cães com diferentes cargas parasitárias na sua infectividade ao vetor.

Amorim et al. (2011) realizaram estudo com cães naturalmente infectados e observaram que a carga parasitária de pele dos cães foi menor naqueles que eram não infectantes ao xenodigamóstico. Laurenti et al. (2013) não observaram relação entre a carga parasitária de pele de cães, sintomáticos ou assintomáticos, com a transmissibilidade do parasito ao vetor.

VIGILÂNCIA E CONTROLE

As estratégias de controle da LV no Brasil estão baseadas no diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, no controle dos vetores através do uso de inseticidas e na triagem sorológica com posterior eutanásia de cães positivos para leishmaniose (COSTA;VIEIRA, 2001; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001).

A adoção da eutanásia como medida de controle de qualquer zoonose, em geral, não tem a adesão de grande parcela da população. Além do aspecto de proteção e bem-estar animal, há controvérsias no que diz respeito à eficiência da eutanásia de cães sorologicamente positivos como medida de controle da LV (COSTA, 2011; COURTENAY et al., 2002; GRIMALDI et al., 2012), isto porque ainda existe a dificuldade em correlacionar soropositividade com infectividade em cães (ASHFORD et al., 1995), bem como pelo período de pré-patência, quando o animal infectado pelo protozoário ainda não apresenta soroconversão.

No ano de 2011 o Ministério da Saúde recomendou a utilização do teste rápido “*Dual Path Platform- DPP*” (Bio-Manguinhos[®]), com rK28 e ouro coloidal para triagem dos cães e confirmação dos positivos por meio do teste de ELISA com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like* (EIE-ELISA, Bio-Manguinhos[®]) (BRASIL, 2011). Desde 2012 esta recomendação vem sendo paulatinamente introduzida.

OBJETIVO

Considerando-se que a resposta imune humoral desenvolvida por cães à infecção natural por *Leishmania spp.* é dependente da carga parasitária, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se o resultado dos testes diagnósticos atualmente utilizados em inquéritos soro epidemiológicos no Brasil (teste rápido-DPP BioManguinhos[®] e teste ELISA indireto EIE-ELISA BioManguinhos[®]) apresentam alguma relação com a carga parasitária em sangue de cães de área endêmica para leishmaniose visceral.

REFERÊNCIAS

AFONSO, M.M.S.; DUARTE, R.; MIRANDA, J.C.; CARANHA, L.; RANGEL, E.F. "Studies on the feeding Habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (*Diptera: Psychodidae: Phlebotominae*) populations from endemic areas of American visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil," **J. Trop. Med.**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v. 7, n. 5, 2012.

AMORIM, I.F.G.; DA SILVA, S.M.; FIGUEIREDO, M.M., et al. Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis. **Plos One**, v. 6, n. 11, 2011.

ASHFORD, D.A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J.C.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M.C. LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER JÚNIOR, R.H. Comparison of the polimerase chain reaction and serology for the detetion of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, p. 251-255, 1995.

BADARÓ, V.; BENSON, D.; EUHIIIIO, M.C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E.M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J.M.; HOUGHTON, R.L.; DAVID, J.R.; REED, S.G. rK39: A Cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, Concise Communications; v. 173, p. 758-761, 1996.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da**

Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120 p.: il. color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos); 2006.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. **Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde**, NOTA TÉCNICA n. 2011, UVR/CGDT/DEVEP/SVS/MS, 2011.

BRAY, D.P.; ALVES, G.B.; DORSAL, M.E.; BRAZIL, R.P; HAMILTON, J.G.C. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* to experimental chicken sheds treated with insecticide. **Parasites and Vectors**, v. 3. p.16, 2010.

BRAZIL, R.P. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 46, n. 3, 2013 .

BRAZIL, R.P.; BRAZIL, B.G. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: RANGEL, E.F.; LAINSON, R. (Ed). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 257-274.

BURNS, J.M.J.; SHREFFLER, W.G.; BENSON, D.R.; GHALIB, H.W.; BADARO, R.; REED, S.G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 775-779, 1993.

CAMARGO-NEVES, V.L.F. **Aspectos epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo, Brasil**. São Paulo, 2004. 225f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

CARSON, C.; QUINNELL, R.J.; HOLDEN, J.; GARCEZ, L.M.; DEBORGGRAEVE, S.; COURTENAY, O. Comparison of *Leishmania* oligoC-Test PCR with conventional and real-time PCR for diagnosis of canine *Leishmania* infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. 3325-3330, 2010.

CASANOVA, C.; ANDRIGHETTI, M.T.; SAMPAIO, S.M.; MARCORIS, M.L.; COLLA-JACQUES, F.E.; PRADO, Â.P. Larval breeding sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic urban areas in Southeastern Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, p. 2443, 2013.

CHANCE, M.L.; EVANS, D.A. The leishmaniasis—the agent. In: GILLES, H.M. (Ed). **Protozoal diseases**, Arnold: London, 1999. p. 419-425.

COSTA, A.I.P.; CASANOVA, C.; RODAS, L.A.C.; GALATI, E.A.B. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo. **Rev. Saúde Pública**, v. 31, p. 632-633, 1997.

COSTA, C.A.; GENARO, O.; DE LANA, M.; MAGALHÃES, P.A.; DIAS, M.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; COSTA, R.T.; MAGALÃES-ROCHA, N.M.; MAYRINK, W. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 24, p. 21-25, 1991.

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. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, p. 232-242, mar-abr 2011.

COSTA, C.H.N.; VIEIRA, J.B.F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 223-228, 2001.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; GARCEZ, L.M.; JEFFREY, J.; SHAW, J.J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J. Inf. Dis.**, v. 186, p. 1314-1320, 2002.

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

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

DANTAS-TORRES, F.; LORUSSO, V.; TESTINI, G.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEREDO, L.A.; STANNECK, D.; MENCKE, N.; BRANDÃO-FILHO, S.P.; ALVES, L.C.; OTRANTO, D. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. **Parasitol. Res.**, v. 106, p. 857-860, 2010.

DE OLIVEIRA, F.M. **Morcegos como hospedeiros de *Leishmania* spp. em áreas endêmicas para leishmaniose visceral.** 2012. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba, Araçatuba, 2012.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DIAS, F.O.; LOROSA, E.S.; REBÊLO, J.M. Blood feeding sources and peridomiciliation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cad. Saúde Pública**, v. 19, p. 1373-1380, 2003.

DUPREY, Z.H.; STEURER, F.J.; ROONEY, J.A.; KIRCHHOFF, L.V.; JACKSON, J.E.; ROWTON, E.D.; SCHANTZ, P.M. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000–2003. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, p. 440-446, 2006.

FELICIANGELI, M.D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Med. Vet. Entomol.**, v. 18, p. 71-80, 2004.

FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona, Spain. Canine Leishmaniasis: an update. Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet, p. 6-10, 1999.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v.137, p. 214-21, 2006.

GENARO, O.; COSTA, R.T.; FRANÇA SILVA, J.C.; REIS, A.B.; VIEIRA, E.P.; ARIAS, J.R.; MONTEIRO, P.S.; REED, S.G.; MAYRINK, W.; da COSTA, C.A.; NETTO, E.M.; BADARO, R. Evaluation of immunochromatographic Assay for the Diagnosis for Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania chagasi* in Brasil. **Acta Parasitol. Turcica**, v. 21, p. 93, 1997.

GOMES, L.H.; SICILIANO, M.M.; CRUZ, L.L.; TOLEZANO, J.E.; HIRAMOTO, R.M.; REICHMANN, M.L.A.B.; TAKAOKA, N.Y.; CIARAVOLO, R.M.C.; RANGEL, O. (Comitê de Leishmaniose Visceral Americana da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, SP, Brasil). Classificação epidemiológica dos

municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, atualizado em novembro de 2011.

Bol. Epimiol. Paulista, v. 8, p. 32-36, 2011.

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

GOSSAGE, S.M.; ROGERS, M.E.; BATES, P.A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: Implications for understanding the life cycle. **Internat. J. Parasitol.**, v. 33, p. 1027-1034, 2003.

GRAMICIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Vet. Parasitol.**, v.181, p. 23-30, 2011.

GRIMALDI JÚNIOR, G.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med.**, n. 106, p. 54-59, 2012.

HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol.**, v. 27, p. 403-409, 2011.

KAMHAWAI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends Parasitol.**, v.22, p.439-445, 2006.

KEENAN, C.M.; HENDRICKS L.D.; LIGHTNER L.; WEBSTER H.K.; JOHNSON A.J. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Vet. Pathol.**, v. 21, p. 74, 1984.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin. dermatol.**, v. 17, p. 279-289, 1999.

KOUTINAS, A.F.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; MYLONAKIS, M.E.; LEONTIDES, L.; POLIZOPOULOU, Z.; BILLINIS, C.; ARGYRIADIS, D.; DIAKOU, N.; PAPADOPOULOS, O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 98, p.247-61, 2001.

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

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

LANOTTE, G.; RIOUX, J.A.; PERIERS, J.; VOLHARDT, Y. Ecology of the leishmaniasis in the south of France; developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, v. 54, p. 277-295, 1979.

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

MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Vet. Parasitol.**, v. 65, p. 1-9, 1996

MANCIANTI, F.; FALCONE, M.L.; GIANNELLI, C.; POLI, A. Comparison between an enzyme linked immunosorbent assay using a detergent soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 59, p. 13-21,1995.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Res. Vet. Sci.**, v.1, p. 76-78, 2009

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M.D.; ARIAS, J. Metodos de Captura, Conservacion y Montaje de los Flebotomos (*Diptera: Psychodidae*). Organización Panamericana de la Salud, **Ofic. Sanit. Panam.**, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Washington, D.C. 72 p; 1997.

MARTINS-MELO, F.R.; LIMA, M.S.; RAMOS JÚNIOR, A.N.; ALENCAR, C.H.; HEUKELBACH, J. Mortality and case fatality duo to visceral leishmaniasis in Brazil: A Nationwide analysis of Epidemiology, Trends and Spatial Patterns. **Plos One**, v. 9, n. 4, abr 2014.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* Infections in dogs. **J. Clin. Microbiol.**, p. 5515–5519, nov. 2005.

MICHALSKY, E.M.; ROCHA, M.F.; LIMA, A.C.V.M.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; PIRES, M.Q.; OLIVEIRA, F.S.; PACHECO, R.S.; SANTOS, S.L.; BARATA, R.A.; ROMANHA, A.J.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Vet. Parasitol.**, v. 147, p. 67-76, 2007.

MONTEIRO, S.P.; LACERDA, M.M.; ARIAS, J.R. Controle da leishmaniose no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 27, p. 67-72, 1994.

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

MORRISON, A.C.; FERRO, C.; MORALES, A.; TESH, R.B.; WILSON, M.L. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **J. Med. Entomol.**, v. 30, p. 427-35, mar. 1993.

OLIVEIRA, A.G.; MARASSÁ, A.M.; CONSALES, C.A.; DORVAL, M.E.C.; FERNANDES, C.E.; OLIVEIRA, G.B.; BRAZIL, R.P.; GALATI, E.A.B. "Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Tropica**, v. 107, p. 238-241, 2008.

OZENZOY, S. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 363-369, 1998.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATINIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, p.510-517, 2001.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Vet Med Today: Reference Point*. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 236, p. 1184-1191, 2010.

PATTABHI, S.; WHITTLE, J.; MOHAMATH, R.; EL-SAFI, S.; MOULTON, G.G.; GUDERIAN, J.A.; COLOMBARA, D.; ABDOON, A.O.; MUKHTAR, M.M.; MONDAL, D.; ESFANDIARI, J.; KUMAR, S.; CHUN, P.; REED, S.G.; BHATIA, A. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 4, p. 822, 2010

PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. Diagnóstico molecular das leishmanioses: contribuição ao Programa de Vigilância e Controle da LVA no Estado de São Paulo. **Bol. Epi. Paulista**, v. 6, p. 4-13, 2009.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 229-235, 1994.

QUARESMA, P.F.; MURTA, S.M.F.; FERREIRA, E.C.; ROCHA-LIMA, A.C.V.M.; XAVIER, A.A.P.; GONTIJO, C.M.F. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, n. 111, p. 289-294, set. 2009.

QUINNELL, R.J.; DYE, C. An experimental study of the peridomestic distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Bull. Entomol. Res.**, v. 84, p. 379-382, 1994.

RAMOS, R.A.N.; RAMOS, C.A.N.; JUSI, M.M.G.; ARAÚJO, F.R.; MACHADO, R.Z.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C. Polymerase chain reaction and real-time PCR for diagnosing of *Leishmania infantum chagasi* in dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 21, n. 3, p. 192-195, 2012.

READY, P.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clin. Epidemiol.**, v.2014, n. 6, p. 147-154, 2014.

RICHARDS, W.; ASHFORD, D. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin. Dermatol.**, v.14, p. 523-532, 1996.

RUTLEDGE, L.C.; ELLENWOOD, D.A. Production of phlebotomine sandflies on the open forest floor in Panama: the species complement. **Environ. Entomol.**, v. 4, p. 71–77, 1975.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; HOFFMANN M.P.; DE FREITAS, R.A.; DE MALACCO, M.A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med. Vet. Entomol.**, v. 12, p. 315-317, 1998.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias e Coordenadoria de Controle de Doenças. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo** São Paulo: A Secretaria, 2006.

SÃO PAULO. Secretaria De Estado Da Saúde Do Estado De São Paulo. Centro De Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. **Leishmaniose visceral americana humana: distribuição do número de casos e óbitos de LVA segundo município e GVE de infecção.** Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_lpi.htm > Acesso em: 01 maio 2014.

SCALONE, A.; DE-LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Vet. Parasitol.**, v. 104, p. 275-285, 2002.

SOARES, M.R.A.; MENDONÇA, I.L.; BONFIM, M.; RODRIGUES, J.L.; WENECK, G.L.; COSTA, C.H.N. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Tropica**, v.117, p.6-9, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 165, p. 1-18, 2009.

SILVA, F.L.; OLIVEIRA, R.G.; SILVA, T.M.A., XAVIER, M.N.; NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Veneral transmission of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 160, p. 55-59, 2009a.

SILVA, S.M.; RIBEIRO, V.M.; RIBEIRO, R.R.; TAFURI, W.L.; MELOA, M.N.; MICHALICKA, M.S.M. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 166, 159-162, 2009b.

SOARES, M.R.A.; MENDONÇA, I.L.; BONFIM, M.; RODRIGUES, J.L.; WENECK, G.L.; COSTA, C.H.N. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Tropica**, v.117, p.6-9, 2011.

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C.L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania Infantum* DNA in dogs. **J. Infect. Dis.**, v. 189, p. 1729-1733, 2004.

TRAVI, B.L.; FERRO, C.; CADENA, H.; MONTOYA-LERMA, J.; ADLER, G.H. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. **Res. Vet. Sci.**, v. 72, p. 83-86, 2002.

WHO. World Health Organization. **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Technical report series. Geneva, n. 949, 22-26 March 2010.

CAPÍTULO 2 - PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania spp.* E CARGA PARASITÁRIA EM SANGUE DE CÃES DE ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL*

RESUMO - A identificação do reservatório canino da leishmaniose visceral (LV) é uma das medidas de controle desta zoonose e baseia-se na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em amostras de soro. Este estudo avaliou o desempenho relativo dos testes diagnóstico atualmente utilizados no Brasil para inquéritos soro-epidemiológicos (Teste rápido DPP e EIE-ELISA, BioManguinhos[®]), comparando-os aos resultados da carga parasitária avaliada por PCR em tempo real (qPCR). Foram utilizadas amostras de sangue e soro de 610 cães de 28 cidades da região noroeste do Estado de São Paulo, endêmica para LV. A positividade observada ao DPP foi de 33,8%, ao EIE-ELISA 15,9% e à qPCR 68,4%, com sensibilidade de 33,1% ao DPP, 17,0% ao EIE-ELISA e 12,9% quando realizados em série, e especificidade de 64,8%, 86,5% e 88,6% respectivamente. A concordância entre os resultados do DPP e EIE-ELISA foi sofrível (Kappa=0,37), e muito pobre entre qualquer um deles e a qPCR (Kappa<0,05). Observou-se diferença estatisticamente significativa (p=0,0008) para os valores de carga parasitária entre os cães considerados negativos e positivos ao teste EIE-ELISA ou ao DPP (p=0,03), bem como quando se considerou o resultado dos dois testes em série (p=0,0008), indicando que a média da carga parasitária dos cães positivos é maior do que a dos negativos. Entretanto, a avaliação do potencial de transmissão dos cães sorologicamente negativos faz-se necessária.

Palavras-Chave: Leishmaniose visceral, diagnóstico, teste rápido, ELISA, qPCR.

PRESENCE OF ANTI *Leishmania* spp. ANTIBODY AND PARASITE LOAD IN DOGS FROM A VISCERAL LEISHMANIASIS ENDEMIC AREA

SUMMARY – The detection of antibodies in dogs, followed by euthanasia, is one of the measures used to control visceral leishmaniasis (VL) in Brazil. We've evaluated the relative performance of the diagnostic tests currently in use in Brazil for sero-epidemiological surveys (DPP rapid test and EIE-ELISA, BioManguinhos™) comparing them to real time PCR (qPCR) parasite load results. Blood and serum samples of 610 dogs from 28 endemic cities for VL in the northwestern region of São Paulo, were used. Positivity was 33.8 % by DPP, 15.9% by EIE-ELISA and 68.4% by qPCR. Sensitivity was 33.1% for DPP, 17.0% for EIE-ELISA and 12.9% when considering DPP and EIE-ELISA performed in serial, while specificity was 64.8%, 86.5%, and 88.6%, respectively. Agreement between DPP and EIE-ELISA results was considered fair ($\kappa=0.37$), and very poor between any of the tests and qPCR ($\kappa < 0.05$). There was a statistically significant difference on the parasite load ($p=0.0008$) between negative and positive dogs by EIE-ELISA or DPP ($p=0.03$), or when considering the outcome of the two tests in serial ($p=0.0008$), indicating that the mean parasite load of the positive dogs is higher than the negative ones. Nevertheless, the potential of transmission of the negative dogs shall be investigated.

Key-words: Visceral leishmaniasis, diagnosis , rapid test , ELISA , qPCR.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica grave com letalidade de até 10% em pacientes humanos, quando não tratados adequadamente. É considerada uma das zoonoses mais importantes no mundo, dada sua alta incidência e mortalidade (ALENCAR; DIETZE, 1991; BRASIL, 2006; DESJEUX, 2004), principalmente em crianças, indivíduos subnutridos e em pacientes imunocomprometidos (BRASIL, 2006; MADALOSSO et al., 2012; SOUSA-GOMES et al., 2011).

As estratégias de controle da LV no Brasil estão baseadas no diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, no controle dos vetores por meio do uso de inseticidas e na triagem sorológica, com posterior eutanásia de cães positivos para leishmaniose (BRASIL, 2006; COSTA; VIEIRA, 2001; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001).

Anualmente um grande esforço é empenhado pelo governo para se prevenir e controlar a leishmaniose visceral, através de ações como a eutanásia do reservatório canino, realizada com base nos resultados do teste imunocromatográfico (DPP-BioManguinhos[®]) seguido por confirmação pelo teste de ELISA (EIE-BioManguinhos[®]). Porém, esta ação é eficaz quando os testes diagnósticos apresentam a maior sensibilidade possível (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001; 2004), associada à realização da eutanásia dos cães infectados no menor tempo após diagnóstico e, quando os resultados se correlacionam com a infectividade dos cães (COURTENAY et al., 2002).

A adoção da eutanásia como medida de controle de qualquer zoonose, em geral, não tem a adesão de grande parcela da população, devido à estima dos proprietários por seus animais, e por parte da comunidade científica particularmente pela dificuldade em correlacionar soropositividade com infectividade em cães e a eficácia desta medida no controle da leishmaniose visceral canina (LVC) (ASHFORD et al., 1995; COSTA, 2011; COURTENAY et al., 2002; GRIMALDI JÚNIOR et al., 2012b; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013).

Os cães são o principal agente na transmissão da LV não só pelo estreito relacionamento do cão com os humanos, mas também por sua incapacidade imunológica em responder à enfermidade com sucesso na maioria dos casos, onde apenas 15% dos cães infectados são capazes de impedir o estabelecimento da doença ou até mesmo curar espontaneamente (FISA et al., 1999). A resposta imune humoral é possivelmente desenvolvida de maneira dependente da carga parasitária (COURTENAY et al., 2002; MANNA et al., 2009). A infectividade ao vetor, por sua vez, pode ser influenciada pela carga parasitária, já demonstrada em medula óssea (COURTENAY et al., 2002) e em linfonodo (LAURENTI et al., 2013) do animal infectado.

Considerando-se que a resposta imune humoral desenvolvida por cães à infecção natural por *Leishmania spp.* é dependente da carga parasitária, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se o resultado dos testes diagnósticos atualmente utilizados em inquéritos soro epidemiológicos no Brasil (teste rápido-DPP BioManguinhos® e teste ELISA indireto EIE-ELISA BioManguinhos®) apresentam relação com a carga parasitária circulante de cães de área endêmica para leishmaniose visceral.

MATERIAL E MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM

Este estudo transversal foi realizado em 28 cidades da região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil, selecionadas por conveniência e segundo a classificação epidemiológica da época (GOMES et al., 2011), sendo 22 cidades com transmissão canina e humana de LV, cinco com transmissão canina somente e uma sem transmissão, porém, com presença do vetor e próximo a dois importantes eixos viários.

A região noroeste do Estado de São Paulo apresenta clima tropical com invernos secos e verões chuvosos com a temperatura média do mês mais frio

maior ou igual a 18°C e a do mês mais quente maior ou igual a 22°C (ROLIN et al., 2007).

Considerando distribuição normal, prevalência de LVC de 2% e erro de estimativa de 5%, o tamanho amostral foi calculado em 500. Optou-se por avaliar 610 cães de diferentes raças, sexo, idade, porte e pelagem, de domicílios selecionados intencionalmente por terem a presença de pelo menos uma galinha, hospedeiro que favorece a presença de flebotomíneos (AFONSO et al, 2012; CASANOVA et al., 2013; LAINSON; RANGEL, 2005; MOREIRA et al., 2003). A indicação do cão a ser avaliado foi feita pelo residente.

COLETA DE DADOS

Os proprietários, após consentirem com a participação na pesquisa, responderam a um questionário que abrangia os dados de identificação do proprietário, número de cães que habitavam a mesma casa, número de galinhas coabitando com os cães, dados do cão avaliado (raça, idade e sinais clínicos), bem como dados do peridomicílio.

SINAIS CLÍNICOS

Os cães foram avaliados para presença ou ausência de sinais clínicos que usualmente levariam o proprietário a encaminhar este animal a um médico veterinário: emaciação, lesões de pele (lesões ulcerativas, dermatite, hiperqueratose, alopecia), onicogribose, conjuntivite, uveíte, linfadenomegalia, claudicação, palidez de mucosas e aumento de volume abdominal.

COLHEITA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Após consentimento e indicação do proprietário, o cão foi contido com focinheira e a colheita de sangue foi realizada pela veia cefálica ou jugular. Para a realização dos testes DPP e EIE-ELISA (BioManguinhos[®]) as amostras de sangue colhidas foram depositadas em tubos plásticos, sem anticoagulante, e mantidas em temperatura ambiente, por no máximo 12 horas, até serem

centrifugadas a 500g, durante 7 minutos, para separação da fração sérica, a qual foi armazenada em alíquotas, a -20°C.

Para a realização da PCR em tempo real a amostra de sangue foi distribuída homoganeamente sobre o campo delimitado de papel filtro FTA (Whatman®), o qual foi secado sob condições ambientais, *overnight*, acondicionado individualmente em embalagem plástica com sílica hermeticamente fechada (CORRAN et al., 2008), e armazenado em temperatura ambiente.

Os testes foram conduzidos em duplo cego, de modo a não possibilitar a identificação das amostras.

TESTE RÁPIDO DPP E EIE-ELISA BIOMANGUINHOS®

Os testes sorológicos imunocromatográfico DPP-LVC e ELISA indireto EIE-LVC (BioManguinhos®), com o antígeno recombinante rK28 associado a ouro coloidal e antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like* obtidos a partir de cultura *in-vitro*, respectivamente, foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal – LBBMA da UNESP de Araçatuba.

As amostras foram classificadas, ao DPP, segundo a ausência de formação de uma linha (negativo) e presença de uma linha de intensidade variável (entre fracamente positiva, positiva e fortemente positiva), de acordo com as recomendações do fabricante.

Ao teste EIE-ELISA, as amostras foram testadas em duplicatas e foram consideradas positivas quando o valor da média das densidades ópticas era maior que 2,4 vezes a média da densidade óptica (D.O.) dos quatro controles negativos. Valores entre 2 e 2,4 vezes a média da D.O. dos controles negativos foram consideradas indeterminadas, de acordo com as recomendações do fabricante. Amostras consideradas indeterminadas após repetição do teste EIE-ELISA, foram consideradas positivas para fins de análise.

AMPLIFICAÇÃO DE kDNA POR PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

A qPCR foi realizada no *Ecology and Epidemiology Laboratory* (C123) da *School of Life Science* na *Universidade de Warwick*, Inglaterra, a partir de sangue total estabilizado nos cartões FTA (Whatman[®]), devido à facilidade de coleta de material e eficácia comprovada. O DNA foi extraído e purificado com o *kit Chemagic Blood Spot Kit LH* (PerkinElmer[®]), de acordo com as recomendações do fabricante.

Para amplificar uma região conservada do kDNA de *Leishmania spp.* de 120pb, utilizaram-se os oligonucleotídeos iniciadores Leish1 (AACTTTTCTggTCCTCCgggTAg), Leish2 (ACCCCAgTTTTCCgCC) e sonda (6FAM-AAAAATgggTgCAgAAACCCcgTTC—BBQ), de acordo com Francino et al. (2006), com adaptações.

Em cada reação foram utilizados 900 nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 250 nM de DNA, 6,5µL de TaqMan[®] master mix (2X) (Applied Biosystems[®]), em um volume final de 15 µL. As condições da qPCR foram de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C, por 15 segundos, e 60°C, por 60 segundos (Applied Biosystems[®] 7500 Fast Real-Time PCR system).

A quantificação absoluta de *Leishmania spp.* foi feita com base na comparação dos valores dos limiares de fase exponencial (C_T -do inglês *cycle threshold*) com os obtidos na curva padrão, construída a partir de 10 séries de diluições (0,01 a 10^5 parasitos/mL) de DNA extraído de cultura de promastigotas de *Leishmania infantum* (ITAMP-263 DD8). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A concordância entre as técnicas diagnósticas foi avaliada por meio do coeficiente de concordância Kappa e interpretado de acordo com a classificação de Landis e Koch (1977). Para o cálculo da sensibilidade de cada teste considerou-se a qPCR como padrão ouro.

A associação entre o resultado dos testes sorológicos e os resultados da qPCR (cargas nulas X cargas maiores que 0) foi realizada pelo teste de χ^2 utilizando-se o programa BioEstat (5° edição).

Os valores de carga parasitária foram transformados para logaritmos de base 10, a fim de que obtivéssemos uma distribuição log normal dos dados, uma vez que a distribuição dos valores de carga parasitária apresentou-se assimétrica. Avaliou-se então a igualdade de variâncias dos valores de cargas parasitárias diferentes de zero, de acordo com os resultados de cada teste sorológico, utilizando-se o teste F. Diferenças nos valores médios de carga parasitária de resultados positivos e negativos em cada um dos testes sorológicos foram avaliados pelo teste t, ou teste t para variâncias não homogêneas. Esta etapa foi realizada utilizando-se um script desenvolvido localmente no programa R. Adotou-se nível de confiança de 95% em todas as análises estatísticas.

COMITÊ DE ÉTICA

Esta pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UNESP, câmpus de Araçatuba (processo FOA - 01400-2012).

RESULTADOS

As residências avaliadas possuíam em média 2,4 cães e 45 galinhas. Os quintais não eram cimentados em 71% das residências, 64,4% foram considerados com condições propícias para o desenvolvimento de flebotomíneos. Setenta e nove por cento (449/568) dos moradores não realizavam quaisquer estratégias de prevenção da LVC.

Os cães apresentavam idade média de 40 meses, tendo o mais novo dois meses e o mais velho 240 meses; 52,4% (319/609) dos cães eram machos e 47,6% (290/609) fêmeas; 77,2% (437/566) dos animais não possuíam raça definida. Dos cães estudados, apenas 12,3% (68/552)

apresentavam sinais que poderiam induzir o proprietário a levar o animal ao veterinário.

A positividade para a presença de anticorpos anti-*Leishmania* observada ao DPP foi de 33,8% (206/610), ao EIE-ELISA 15,9% (97/610), ao DPP e EIE-ELISA quando realizados em série 12,5% (76/610) e à qPCR foi de 68,4% (417/610). O DPP apresentou a maior sensibilidade, seguida do EIE-ELISA e DPP e EIE-ELISA quando realizados em série (Tabela 1). A maior especificidade foi observada ao realizar os testes DPP e EIE-ELISA em série, em seguida pelo teste EIE-ELISA e DPP (Tabela 1).

Tabela 1- Sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos DPP, EIE-ELISA e DPP seguido de EIE-ELISA quando realizados em série (DPP+EIE) e número de cães positivos para leishmaniose visceral canina de acordo com cada teste (n=610)

Teste	Sensibilidade(%)	Especificidade(%)	cães positivos (n)
DPP	33,1	64,8	206
EIE-ELISA	17,0	86,5	97
DPP+EIE	12,9	88,6	76

Grande parte dos cães que foram considerados positivos ao DPP apresentaram resultado negativo ao ELISA (63,1%), confirmando a característica de maior especificidade desta estratégia. Entretanto, de 97 cães considerados positivos ao EIE-ELISA somente 76 eram positivos ao DPP, ou seja, 21,7% dos cães eram falsos negativos ao teste de triagem, resultando em 3,4% de cães possivelmente infectados que permanecem na população.

A concordância entre os resultados do DPP e EIE-ELISA, foi considerada razoável (*fair*) (Kappa=0,37) (Tabela 2), pobre entre os resultados do DPP e qPCR (Kappa= -0,02) (Tabela 3) bem como entre os do EIE-ELISA e

qPCR (Kappa=0,03) (Tabela 4), ou entre os resultados do DPP e ELISA (realizados em série) e os da qPCR (Kappa=0,01) (Tabela 5).

Os resultados ao DPP estiveram significativamente associados aos do teste EIE-ELISA ($p < 0,0001$), ao teste de χ^2 para independência, porém, os resultados dos testes EIE-ELISA, teste rápido DPP ou DPP e EIE-ELISA (realizados em série) não apresentaram associação significativa com os resultados de positividade (carga parasitária > 0) ou negatividade observados à qPCR ($p > 0,05$).

Tabela 2- Distribuição dos resultados do DPP de acordo com os do EIE-ELISA

DPP	EIE-ELISA				Total
	POS	%	NEG	%	
POS	76	12	130	21	206
NEG	21	3	383	63	404
Total	97	-	513	-	610

Tabela 3- Distribuição dos resultados do DPP de acordo com os da qPCR

DPP	qPCR		Total
	POS	NEG	
POS	138	68	206
NEG	279	125	404
Total	417	193	610

Tabela 4- Distribuição dos resultados do EIE-ELISA de acordo com os da qPCR

EIE- ELISA	qPCR		Total
	POS	NEG	
POS	71	26	97
NEG	346	167	513
Total	417	193	610

Tabela 5- Distribuição dos resultados do DPP e EIE-ELISA quando realizados em série de acordo com os da qPCR

DPP + EIE-ELISA	qPCR		Total
	POS	NEG	
POS	54	22	76
NEG	363	171	534
Total	417	193	610

Considerando-se apenas os cães que apresentaram carga parasitária à qPCR, obtivemos uma distribuição não Normal, com mediana de 19,6 parasitos/mL de sangue, variando de 0,04 a 2.370 parasitos/mL de sangue. Os cães negativos ao teste EIE-ELISA possuíam em média 18,3 parasitos/mL, (\log_{10} 2,9 parasitos/mL), e os animais positivos em média 44,7 parasitos/mL (\log_{10} 3,7 parasitos/mL) (Figura 1a). Os cães negativos ao DPP possuíam em média 18,6 parasitos/mL (\log_{10} 1,3 parasitos/mL) e os positivos em média 27,9 parasitos/mL (\log_{10} 1,5 parasitos/mL) (Figura 1b). Já os cães considerados positivos ao teste DPP e ao teste EIE-ELISA (testes em série) apresentaram

em média 50,9 parasitos/mL (\log_{10} 1,7 parasitos/mL) ao passo que os negativos apresentaram em média 18,7 parasitos/mL (\log_{10} 1,3 parasitos/mL) (Figura 1c).

Observou-se que a carga parasitária média dos animais positivos aos testes DPP, EIE-ELISA ou DPP e EIE-ELISA (realizados em série) foi significativamente maior do que a dos negativos ($p < 0,05$) ao teste t (Figura 1).

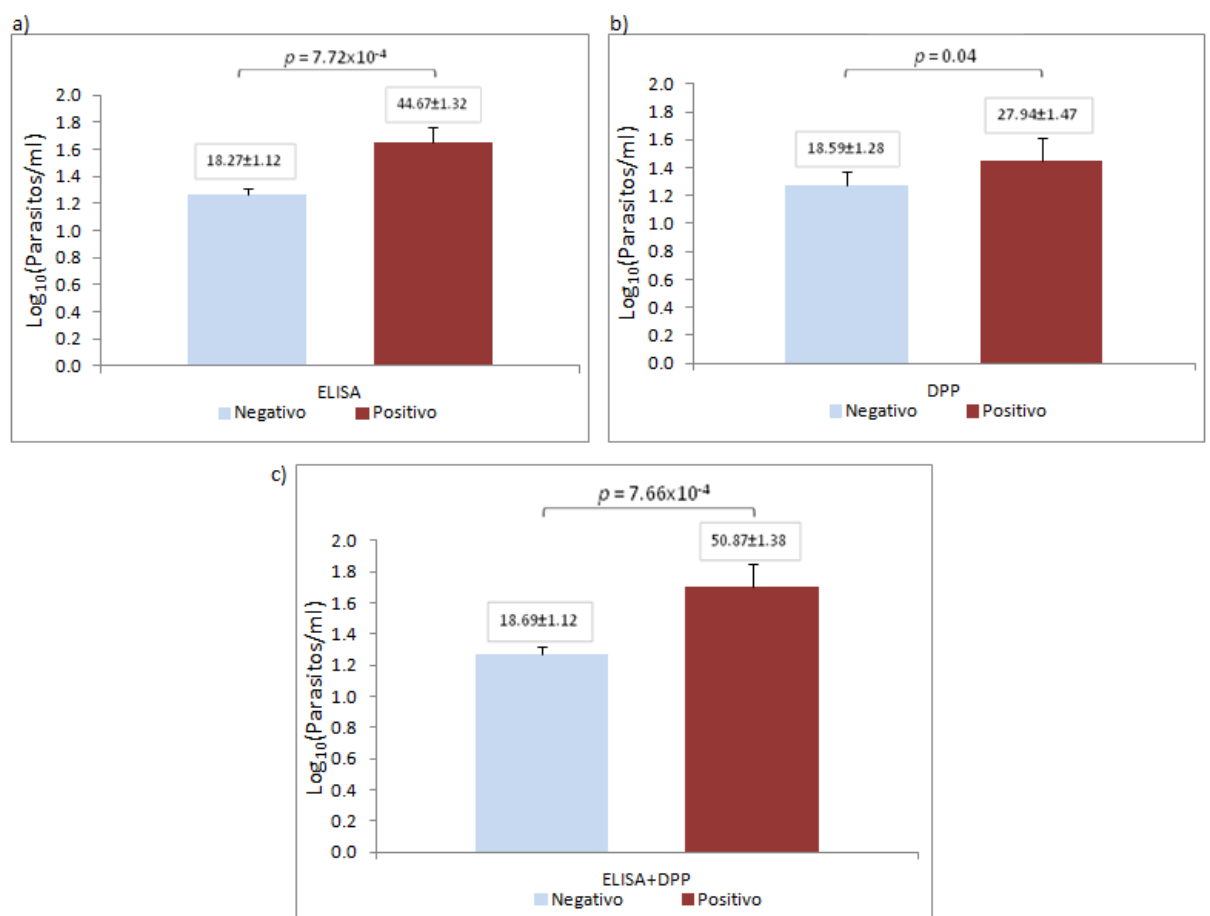


FIGURA 1- Carga parasitária de cães de acordo com o resultado a) do teste EIE-ELISA; b) do teste DPP; c) dos testes EIE-ELISA e DPP realizados em série. Carga parasitária de *Leishmania* spp. avaliada por qPCR.

Observou-se forte associação entre presença de sinais observáveis pelos proprietários e o resultado sorológico positivo ($p < 0,0001$) (Tabela 6); já a carga parasitária no sangue não se revelou estatisticamente associada à presença de sinais ($p > 0,05$) (Tabela 7). 86% dos animais assintomáticos eram positivos à qPCR.

Tabela 6- Distribuição dos resultados sorológicos de acordo com presença ou ausência de sinais clínicos

Sinais	Geral sorológico				Total
	POS	%	NEG	%	
Presente	19	28	49	10	68
Ausente	48	72	436	90	484
Total	67	100	485	100	552

Tabela 7- Distribuição dos resultados do qPCR de acordo com presença ou ausência de sinais clínicos

Sinais	qPCR				Total
	POS	%	NEG	%	
Presente	52	14	16	9	68
Ausente	320	86	164	91	484
Total	372	100	180	100	552

DISCUSSÃO

Na presente pesquisa a presença de anticorpos anti-*Leishmania spp.* identificada pelos testes DPP e/ou EIE-ELISA e a carga parasitária foram avaliadas e relacionadas, com o intuito de melhor caracterizar o diagnóstico sorológico utilizado para identificação do reservatório canino no Brasil.

A concordância razoável observada entre os testes DPP e EIE-ELISA pode estar relacionada a diferentes sensibilidades e especificidades observadas em cada um dos testes que, juntamente com os valores baixos de sensibilidade e especificidade, contribuem para a baixa eficácia da estratégia de inquéritos soro-epidemiológicos seguida de eutanásia recomendada pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) do Brasil. O sucesso dos programas de controle da doença depende diretamente de diagnóstico preciso, rápido e da eliminação do hospedeiro tão rápido este seja identificado (COURTENAY et al., 2002). Diagnósticos com baixa sensibilidade não são as melhores opções para os testes de triagem. Da mesma forma que testes com baixos índices de especificidade não são confirmatórios.

A ausência de associação significativa e baixa concordância entre os resultados sorológicos e os da qPCR observados corroboram com os de Risueño et al. (2012) que observaram fraca concordância entre os resultados de ELISA e os da qPCR, tanto em amostras de linfonodo, pele ou baço quanto nas de sangue. Laurenti et al. (2013) também não observaram correlação entre a carga parasitária avaliada por imunohistoquímica em pele e os níveis de imunoglobulinas. Já Mohammadiha et al. (2013) observaram concordância quase que perfeita entre o teste de aglutinação direta (títulos $\geq 1/80$) e os resultados da qPCR em soro canino.

A falta de associação e baixa concordância provavelmente se relacionam à natureza diferente das variáveis analisadas (anticorpos x DNA), sendo que a produção de anticorpos depende da resposta imune do hospedeiro, a qual pode ser predominantemente humoral ou celular (PALTRINIERI et al., 2010; PINELLI et al., 1994). Além disto, a resposta imune do cão é influenciada por outros fatores como seu estado nutricional, o estágio de evolução da doença e o tempo decorrido da infecção (MORENO; ALVAR, 2002).

Os testes DPP e EIE-ELISA apresentaram baixa sensibilidade comparando-se à sensibilidade da qPCR, muito provavelmente pelo fato dos

testes sorológicos dependerem da produção de anticorpos do hospedeiro para então serem detectados, ao passo que a qPCR pode detectar o parasito antes mesmo do desenvolvimento de resposta imune do animal, apresentando menor interferência do cão hospedeiro e detectando mais precocemente o parasito no cão (QUINNELL et al., 2001). Baneth e colaboradores (2008) demonstraram que, dentre todos os animais com leishmaniose visceral, apenas uma pequena parcela desenvolve sinais, uma parcela um pouco maior apresenta anticorpos anti-*Leishmania spp.* e, outra parcela maior que a anterior, apresenta resultados positivos à PCR. Grimaldi Júnior. et al. (2012a) também observaram baixa sensibilidade do teste rápido DPP (47%) utilizando o exame parasitológico como padrão ouro e sugeriram que, para maior eficiência do PVCLV do Brasil, um teste que possibilitasse a detecção de animais infectados o mais cedo possível deveria ser desenvolvido. Como a qPCR tem potencial para detectar a presença de DNA circulante mais precocemente que a presença de anticorpos, este seria um teste que resultaria em detecção eficaz do reservatório canino podendo contribuir ainda mais para o controle da LV (COURA-VITAL et al., 2011).

A associação entre a presença de sinais clínicos e os resultados dos testes sorológicos também já foi observada por outros autores (BADARO et al., 1996; GRIMALDI JÚNIOR et al., 2012a; LAURENTI et al., 2013; METLER et al., 2005; MOREIRA et al., 2007) e se relaciona ao fato de que um cão sintomático geralmente apresenta maior produção de anticorpos os quais favorecem o desenvolvimento da doença clínica, resultando em maior chance de detecção de imunoglobulinas pelos testes sorológicos (LAURENTI et al., 2013; PALTRINIERI et al., 2010; PINELLI et al., 1994). Por outro lado, a presença de sinais não esteve significativamente associada à presença de carga parasitária, podendo favorecer a manutenção do reservatório canino na população, já que a presença de sinais clínicos poderia chamar a atenção dos proprietários a possivelmente levar seus cães para serem avaliados para a leishmaniose visceral. Laurenti et al. (2013) ao avaliaram a carga parasitária de linfonodo, baço e pele, por imunohistoquímica, não encontraram associação

com as alterações clínicas. Entretanto, Manna et al. (2009) observaram que há uma tendência dos cães com manifestações clínicas apresentarem maior carga parasitária à qPCR.

Os cães sorologicamente positivos apresentaram carga parasitária significativamente maior que os negativos, podendo esta condição estar relacionada com seu potencial de transmissibilidade. Soares et al. (2011) e Laurenti et al. (2013) observaram que cães assintomáticos eram mais infectantes aos flebotomíneos que os sintomáticos. Estudos sobre a influência que diferentes cargas parasitárias desempenham na resposta do hospedeiro e no seu potencial de transmissão são de suma importância para a interpretação do risco que este animal representa para o homem.

CONCLUSÃO

Não há associação entre a detecção de anticorpos anti-*Leishmania spp.* e a carga parasitária em cães de área endêmica para LV, embora cães sorologicamente positivos tenham carga parasitária média maior que os negativos.

Outros estudos que avaliem a relação entre a carga parasitária do cão e a transmissão do parasito ao vetor são sugeridos a fim de se avaliar o potencial de transmissão dos cães sorologicamente positivos.

REFERÊNCIAS

AFONSO, M.M.S.; DUARTE, R.; MIRANDA, J.C.; CARANHA, L.; RANGEL, E. F. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil, **J. Trop. Med.**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

ALENCAR, J.E.; DIETZE, R. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 706-717.

ASHFORD, D.A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J.C.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M.C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER JÚNIOR, R.H. Comparison of the polimerase chain reaction and serology for the detetion of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n. 3, p. 251-255, 1995.

BADARÓ, V.; BENSON, D.; EUHIIIIO, M.C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E.M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J.M.; HOUGHTON, R.L.; DAVID, J.R.; REED, S.G. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, Concise Communications, v. 173, n. 3, p. 758-761, mar. 1996.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 7, p. 324-330, jul. 2008.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2006.

CASANOVA, C.; ANDRIGHETTI, M.T.; SAMPAIO, S.M.; MARCORIS, M.L.; COLLA-JACQUES, F.E.; PRADO, Â.P. Larval breeding sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic urban areas in Southeastern Brazil. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 9, p. 2443, 2013.

CORRAN, P.H.; COOK, J.; LYNCH, C.; LEENDERTSE, H.; MANJURANO, A.; GRIFFIN, J.; COX, J.; ABEKU, T.; BOUSEMA, T.; GHANI, A.C.; DRAKELEY, C.; RILEY, E. Dried blood spots as a source of anti-malarial antibodies for epidemiological studies. **Malar. J.**, v. 7, n. 195, 2008.

COSTA, C.H.N.; VIEIRA, J.B.F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 223-228, 2001.

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. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, p. 232-242, 2011.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M.J.; VELOSO, V.M.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; REIS, L.E.S.; BRAGA, S.L., MORAIS; M.H.F., REIS; A.B., CARNEIRO, M.A. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v.5, e1291, 2011

COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; GARCEZ, L.M.; JEFFREY J.; SHAW, J.J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 1314-1320, 2002.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, p. 305-318, 2004.

FISA, R.; GALLEGU, M.; CASTILLEJO, S.; AISA, M.J.; SERRA, T.; RIERA, C.; CARRIÓ, J.; GALLEGU, J.; PORTUS, M. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain): the example of the Priorat focus. **Vet. Parasitol.**, v. 83, p. 87-97, 1999.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v.137, p. 214-221, abr. 2006.

GOMES, L.H.; SICILIANO, M.M.; CRUZ, L.L.; TOLEZANO, J.E.; HIRAMOTO, R.M.; REICHMANN, M.L.A.B.; TAKAOKA, N.Y.; CIARAVOLO, R.M.C.; RANGEL, O. (Comitê de Leishmaniose Visceral Americana da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, SP, Brasil). Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, atualizado em novembro de 2011. **Bol. Epidemiol. Paulista**, v. 8 n. 96, p. 32-36, 2011.

GRIMALDI JÚNIOR, G.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L.; DOS SANTOS, C.B.; PINTO, I.D.; DE-AZEVEDO, T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on dual-path platform technology (DPP CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 106, p. 54-59, 2012a.

GRIMALDI JÚNIOR, G.; TEVA, A.; SANTOS, C.B., FERREIRA, A.L.; FALQUETO, A. The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, n. 6, p. 966-971, 2012b.

LAINSON, R.; RANGEL, E. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – a review. **Mem. Inst. Oswaldo cruz**, v. 100, p. 811-827, 2005.

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

LAURENTI, M.D.; ROSSI, C.N.; DA MATA, V.L.R.; TOMOKANE, T.Y.; CORBETT, C.E.P.; SECUNDINO, N.F.C.; PIMENTA, P.F.P.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Vet. Parasitol.**, v. 196, n. 3-4, p. 296-300, set. 2013.

MADALOSSO, G.; FORTALEZA, C.M.; RIBEIRO, A.F.; CRUZ, L.L.; NOGUEIRA, P.A.; LINDOSO, J.A.L. American visceral leishmaniasis: factors associated with lethality in the state of São Paulo, Brazil. **J. Trop. Med.**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Res. Vet. Sci.**, v. 1, p. 76-78, 2009.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs. **J. Clin. Microbiol.**, p. 5515–5519, nov. 2005.

MOHAMMADIHAA, A.; HAGHIGHIA, A.; MOHEBALIB, M.; MAHDIAND, R.; ABADIE, A.R.; ZAREIB, Z.; YEGANEHF, F.; KAZEMIA, B.; TAGHIPOURA, N.; AKHOUNDIB, B.; BARATIB, M.; MAHMOUDIA, M.R. 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.**, v. 192, p. 83-90, 2013.

MOREIRA JÚNIOR, E.D.; SOUZA, V.M.M.; SREENIVASAN, M.; LOPES, N.L.; BARRETO, R.B.; CARVALHO, L.P. Peridomestic risk factors for canine

leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 69, n. 4, p. 393-397, 2003.

MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA, J.F.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Vet. Parasitol.**, v. 145, p. 245-252, 2007.

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

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends Parasitol.**, v. 29, n. 7, p. 339-345, July 2013.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; BATISTA-DE-MELO, L.M.; BORJA-CABRERA, G.P.; PALATNIK, M.; LAVOR, C.C. Improving methods for epidemiological control of canine visceral leishmaniasis based on a mathematical model. Impact on the incidence of the canine and human disease. **An. Acad. Bras. Ciênc**, v. 76, n. 3, p. 583-593, 2004.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical

classification of leishmaniasis in dogs. *Vet Med Today: Reference Point. J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

PINELLI, E.; KILLICK-KEDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNARDINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, E.J. Cellular and humoral immune response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.*, v. 62, p. 229-335, 1994.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J.J.; SHAW, M.A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitol.*, v. 122, p. 253-261, 2001.

RISUEÑO, J.; BERMEJO, E.; MUÑOZ-GARCÍA, C.I.; CHITIMIA, I.; RÍO, L. DEL; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.D.; GOYENA, E.; FISA, R.; RIERA, C.; JIMÉNEZ-MONTALBÁN, P.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A.; MESEGUER-MESEGUER, J.M.; MURCIA, L.; SEGOVIA, M.; BERRIATUA, E. Comparative value of microscopy, serology and real time PCR in the diagnosis of asymptomatic canine *Leishmania infantum* infection. *An. Vet. Murcia*, v. 28, p. 35-43, 2012.

ROLIM, G.S.; CAMARGO, M.B.P.; LANIA, D.G.; MORAES, J.F.L. Classificação climática de Köppen e de Thornthwaite e sua aplicabilidade na determinação de zonas agroclimáticas para o Estado de São Paulo. *Bragantia*, v. 66, p. 711-720, 2007.

SOARES, M.R.A.; MENDONÇA, I.L.; BONFIM, M., RODRIGUES; J.L., WENECK, G.L.; COSTA, C.H.N. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Tropica*, v.117, p.6-9, 2011.

SOUSA-GOMES, M.L.; MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; PELISSARI, D.M.; LIMA JUNIOR, F.E.F.; SENA, J.M.; CECHINEL, M.P. Co-infection *Leishmania*/HIV in Brazil: Epidemiological, clinical and laboratorial aspects. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 20, p. 519-526, 2011.