



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS RECOMBINANTES E PCR EM TEMPO REAL NO
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Gilzane Dantas Nóbrega

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Almeida de Melo

Recife,
2014

Gilzane Dantas Nóbrega

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS RECOMBINANTES E PCR EM TEMPO REAL NO
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Almeida de Melo

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Recife,
2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Nóbrega, Gilzane Dantas

Comparação entre métodos recombinantes e PCR em tempo real no diagnóstico da Leishmaniose visceral canina / Gilzane Dantas Nobrega. – Recife: O Autor, 2014.

62 f.: il.

Orientadores: José Luiz de Lima Filho, Márcia Almeida de Melo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2014.

Inclui referências e anexos

1. Leishmaniose visceral 2. Diagnóstico parasitológico I. Lima Filho, José Luiz de (orient.) II. Melo, Marcia Almeida de (coorient.) III. Título.

616.9363

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-236

“Comparação entre métodos recombinantes e PCR em tempo real no diagnóstico da Leishmaniose visceral canina”

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final exigido para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Data de Aprovação: 31/07/14

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho - (Orientador/UFPE)

Prof. Dr. - **Roberto Afonso da Silva** (UFPE)

Prof. Dr. **Filipe Dantas Torres** - (CPqAM)

*Dedico este trabalho
A Deus;
Aos meus pais Sônia e Gilberto;
Aos meus irmãos Gutemberg, Jefferson e Gêdson;
Meus sobrinhos Vitor e Emilly;
Meu sobrinho adotivo Rhyan e meu afilhado Gustavo;
E a meu amor e esposa Temístocles.*

“A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio”

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pelas oportunidades a mim concedidas e por me fazer entender que tudo tem um propósito e os momentos de aflição são passageiros, que todas as coisas são permitidas por Ti e tem o tempo certo para acontecer. Agradeço-te Deus por tudo!

A meu orientador Prof. Dr. José Luiz, minha co-orientadora a **Profa Dra. Márcia** e ao **Prof. Dr. Paulo** pelos ensinamentos e direcionamentos no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais Sônia e Gilberto, por todo o amor, apoio e força em todos os momentos, principalmente nas horas mais difíceis sempre me incentivando e orando para que Deus guiasse e iluminasse minha vida! Amo muito vocês! Obrigada por tudo!

A meus irmãos Gutemberg, Jefferson e Gêdson e minhas cunhadas Adriana e Islânia pelos momentos de descontração, apoio, incentivo e de muito amor. Amo vocês!

A meus sobrinhos Vítor e Emilly por alegrarem meus dias com esses sorrisos encantadores que mesmo tão pequenos me enchem de amor e orgulho. Titia ama muito vocês!

Ao meu grande amor e esposo Temístocles, por todo apoio, carinho, dedicação e amor, pela divisão das tarefas durante todo esse trabalho, pelas palavras de incentivo e conforto e por ser esse homem tão admirável que todos os dias me faz entender o verdadeiro sentimento do amor. Que Jesus te abençoe sempre. Obrigada, te amo muito!

Aos meus avós Francisca e João Arroz pelo exemplo de amor, **as minhas tias maternas Selma, Célia, Cecília, Celiane, Salete, Celiete, Fatinha, Suelí e tia paterna Maria**, **aos tios maternos João, Chiquinho, Paulinho e Flávio e aos tios paternos Antônio, Manuelzinho, Mário e Germano; a todos os meus primos, minhas tias e tios-tortos, as minhas madrinhas Marieta e Luzia**, enfim a todos que considero minha família pelo amor que me transmitem e por todo o incentivo.

A toda família de Temístocles, por agora serem parte da minha família, **meus sogros Elias e Maria Leoníte, cunhados Tássio, Raikélia, Teócles e Jeane, Tamires e Jadeilson, Tales, meu sobrinho Ryan, Dona Rení, meus cumpadres Aldinho, Marcela e meu afilhado Gustavo** e toda essa família que me acolheu.

A Catarina, por me mostrar que amizade não é receber, é dar; é incentivar; é não criticar, mas apoiar; é compreender; é defender e você amiga durante todos os momentos foi exemplo de que amizade é algo que conquistamos e não tem hora ou lugar, quando você precisar ela vai está lá e você foi assim me auxiliando nos momentos que mais precisei, sempre me incentivando, me fazendo sorrir mesmo nas horas mais difíceis e toda hora me dizendo que tudo no final se concretizaria, eu agradeço a Deus porque hoje eu entendo que perdi uma grande amiga, mas ganhei uma nova irmã, você. Quero agradecer a Deus pela sua vida e que Jesus sempre te abençoe e te conceda a realização de todos os seus objetivos, você estará sempre em minhas orações. Muito obrigada por tudo!

A Raizza que durante toda a pesquisa esteve junto comigo, nas coletas, na realização dos testes, sempre me dando força e me incentivando, me fazendo sorrir nos momentos de desespero, foi nos momentos de aflições e angústias que a vida nos proporcionou construirmos uma verdadeira amizade, não tenho palavras para agradecer, só dizer: Muito Obrigada! Em minhas orações peço a Deus que sempre te guie e te abençoe na sua vida pessoal e profissional.

Aos meus eternos amigos: **Hellen Renatta, Karla, Bartira, José Wilker, Alexandre, Emanuelle, Renato, Verucci, Cassandra e Wanuska**.

Aos meus colegas do laboratório de Biologia Molecular do Semiárido – UFCG/Patos-PB: **Raizza, Anielle, Nedja, Heitor, Natanael, Aline Antas, Laíza, Sandy, Marília, Sônia, Professora Rosália, Leonardo, Erotides, Professor Fernando, Expedito, José Lucas, Clédison e Eurico**, pela realização das coletas e dos testes e por todos os momentos descontraídos, tornando meus dias melhores neste laboratório.

A **Universidade Federal de Pernambuco, a todos os professores e colegas de pós-graduação** em Ciências Biológicas (PPGCB) da UFPE pela amizade, pelos momentos de descontração, pelo apoio e incentivo durante essa jornada que teve início em 2012. A todos muito obrigada, em especial: **Thiago Pajéu, Marcela, Carina Helena, Rosimere, Danilo, Chirlane, Maria das Dores, Ticiane, Aline, Paulo Euzébio, Jana Sandes, Joana, Max, Thiers e os demais colegas**. Agradecer também a secretária do PPGCB **Adenilda (Adê)**, pela preocupação com cada aluno e por manter a organização dessa Pós-graduação.

A **Biogene Indústria e Comércio LTDA**, em especial a **Ivone** por todo o auxílio na realização dos testes e a **Emanuel** por ter aberto as portas dessa empresa durante a realização do trabalho, pelas palavras de incentivo, pelas risadas, enfim por tudo. Agradeço mais uma vez a minha amiga **Catarina Ramos, Lindinalva e Camila**, pelos momentos de descontração. Muito Obrigada, Deus sempre vos proteja!

A Secretaria de Vigilância Ambiental da cidade de Patos-PB, em especial a **Gorete, Argemiro, Eugênio e Eduardo** pela realização dos testes de triagem e todo apoio.

A Secretária de Vigilância Ambiental da cidade de Brejo do Cruz, em especial a **Jandilson e Ricardo** pelo auxílio durante as coletas de sangue e realização dos testes de triagem.

A Secretaria de Vigilância Ambiental da cidade de São José de Espinharas, em especial a **Seu Mirabou e aos agentes de endemias** que nos acompanharam durante todas as coletas nesta cidade e ao laboratório municipal pela realização dos testes de triagem.

A Secretaria de Vigilância Ambiental da cidade de Santa Terezinha, em especial a **Joana, Annielle e a Mamede**, por todo o apoio durante as coletas.

A Secretaria de Vigilância Ambiental da cidade de Aroeiras por todo apoio durante as coletas.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Pós-graduação em Medicina Veterinária especialmente: **Professora Dra Rosane, Viviane e Rodrigo** por todo o apoio que recebi desse laboratório.

A **Tereza** pela ajuda na Bioestatística e pela amizade.

A **Dijanah**, minha amiga que aprendi a dividir a casa e a vida durante o período que passei em Recife, você é uma pessoa incrível, maravilhosa, de um coração tão amável que faz com que todas as pessoas se encantem com seu você. Gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade de te conhecer, sentirei saudades, que Jesus te abençoe. Obrigada amiga!

A **Professora Patrícia** – UFPB/Areia pela disponibilidade em transmitir seu conhecimento em Biologia Molecular.

Ao **Professor Valdir** – Cbiotec UFPB/JP, pelo apoio e incentivo durante o período que passei trabalhando neste departamento.

A **Crispim**, que Jesus sempre te proteja e te conserve, você é um grande amigo que a UFPB me trouxe, muito obrigada pelas palavras de incentivo durante essa caminhada.

Aos meus amigos de trabalho da UFPB-Areia em especial: **Dona Gilma, Simone, Karla Malta, Juliana, Vânia, Dani Lafetá, Ana Luzia, Manuela, Lívia, Fabíola, Juliete, Ivana, Maria de Lurdes, Marquiliano, Rafael, Ruy Brayner, Antônio, George, Edgley e a todos os professores** pelo apoio e incentivo.

Aos **proprietários dos animais** e principalmente aos **animais** que contribuíram para a realização deste trabalho.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram significativamente para concretização deste projeto.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença de caráter zoonótico que reflete em graves problemas à saúde pública. Os cães são os principais reservatórios domésticos do protozoário. No Brasil, uma das formas de controle é a eutanásia dos cães portadores da infecção e nesse contexto, o diagnóstico preciso da LVC é muito importante. Porém, ainda não há um teste altamente sensível e específico, de fácil execução, simples, menos invasivo e de rápido resultado. As avaliações das novas metodologias empregadas para diagnóstico são necessárias ao aprimoramento do programa de controle. Esse estudo teve como objetivo avaliar e comparar dois testes sorológicos que utilizam proteínas recombinantes, sendo um teste imunocromatográfico (TR DPP[®]) com antígeno rk26/rk39/rk9 e um Ensaio Imunoenzimático (ELISA/S7[®]) com HSP70 e um teste molecular, a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real para diagnóstico da LVC no Semiárido Paraibano. Foram utilizadas 258 amostras de soro e sangue total divididas em dois grupos: 212 de animais assintomáticos e 46 de animais sintomáticos obtidos durante um levantamento epidemiológico no Semiárido Paraibano. Os resultados mostraram que do total das amostras, 32,9% (85/258) foram positivas em pelo menos um teste, sendo 29,2 % (62/212) dos animais assintomáticos e 50,0% (23/46) dos animais sintomáticos. Os melhores resultados de concordância entre os testes foram obtidos quando realizada a comparação entre a qPCR e o ELISA/S7[®] mostrando que para animais assintomáticos a sensibilidade e especificidade foi de 74% e 93%, respectivamente e coeficiente *Kappa* de 0,58, os animais sintomáticos apresentaram sensibilidade de 80% e 81% de especificidade com coeficiente *Kappa* de 0,51 revelando moderada concordância em ambos os grupos. Com base nos resultados, o ELISA/S7[®] apresentou um melhor desempenho entre os testes, embora o TR DPP[®] seja um teste de fácil execução e rápido diagnóstico.

Palavras-chave: leishmaniose visceral canina, diagnóstico, teste imunocromatográfico, ensaio imunoenzimático e qPCR.

ABSTRACT

The Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a zoonotic disease that reflects serious problems in public health. Dogs are the main domestic reservoirs of the parasite. In Brazil, one of the ways is to control euthanasia of dogs carrying the infection and in this context, the accurate diagnosis of LVC is very important. However, there is still a highly sensitive and specific simpler, less invasive and rapid result test, easy to perform. New methodologies employed for diagnostic evaluations are necessary to improve the control program. This study aimed to evaluate and compare two serological tests using recombinant proteins, an immunochromatography test (TR DPP[®]) with antigen rk26/rk39/rk9 and an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA / S7[®]) with HSP70 and a molecular test, Polymerase Chain reaction in Real Time to diagnosis of CVL in semi-arid region of Paraiba. 258 samples of serum and whole blood divided into two groups were used: 212 asymptomatic and 46 symptomatic animals. The results showed that the total samples, 32.9% (85/258) were positive in at least one test, 29.2% (62/212) of asymptomatic animals and 50.0% (23/46) of symptomatic animals. The best results of correlation between the tests performed were obtained when comparing the qPCR and ELISA/S7[®] showing that asymptomatic animals for sensitivity and specificity was 74% and 93%, respectively and Kappa coefficient of 0.58, the symptomatic animals showed 80% sensitivity and 81% specificity with a Kappa coefficient of 0.51 revealing moderate agreement in both groups. Based on the results, the ELISA/S7[®] outperformed between tests, although the TR DPP[®] is a test easy to perform and rapid diagnosis.

Keywords: canine visceral leishmaniasis, diagnosis, immunochromatography test, enzyme immunoassay and qPCR.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|--|----|
| Figura 1. Forma amastigota..... | 19 |
| Figura 2. Forma promastigota..... | 19 |
| Figura 3. Ciclo biológico da leishmaniose visceral..... | 20 |
| Figura 4. Ciclo biológico da leishmaniose visceral..... | 22 |

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

- Figura 1.** Dados comparativos da relação dos resultados positivos entre o teste imunocromatográfico (TR DPP[®]), o sorológico (ELISA/S7[®]) e molecular (qPCR) nos grupos de animais assintomáticos e sintomáticos.....43
- Figura 2.** Esquema representativo da relação entre as amostras de animais sintomáticos positivos nos testes diagnósticos da LVC.....45

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

- Tabela 1-** Concordância estimada entre os resultados obtidos com a qPCR, TR DPP[®], ELISA/S7[®] e suas respectivas taxas de sensibilidade, especificidade e o índice *kappa* e sua interpretação para os 212 de animais assintomáticos avaliados no Semiárido Paraibano.....46
- Tabela 2-** Concordância estimada entre os resultados obtidos com a qPCR, como padrão-ouro e os testes sorológicos, suas respectivas taxas de sensibilidade, especificidade e o índice *kappa* e sua interpretação para os 46 animais sintomáticos avaliados no Semiárido Paraibano.....47

LISTA DE ABREVIACÕES

DAT - Teste de Aglutinação Direta

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

ELISA – Enzyme linked immunossorbent assay - (Ensaio Imunoenzimático)

FUNED - Fundação Ezequiel Dias

IgG - Imunoglobulina G

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

LVH - Leishmaniose Visceral Humana

HSP70 - 70 Kilodalton Heat Shock Proteins

mL - Mililitros

µL – Microlitros

kDNA – DNA do Cinetoplasto

K28 – Proteína Recombinante 28

INF- γ - Interferon Gamma

LVC - Leishmaniose visceral canina

Lu. longipalpis - *Lutzomyia longipalpis*

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

rK39 – Antígeno Recombinante de *Leishmania chagasi*

rK26 – Antígeno recombinante de *Leishmania chagasi*

SMF – Sistema Fagocítico Mononuclear

Th1 - Células T *helper* padrão 1

Th2 - Células T *helper* padrão 2

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

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

| | Pag. |
|---|------|
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | ix |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2. OBJETIVOS..... | 17 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 17 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 17 |
| 3. CAPITULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 18 |
| 3.1 Epidemiologia..... | 18 |
| 3.2 Etiologia e Morfologia..... | 18 |
| 3.3 Vetor..... | 20 |
| 3.4 Ciclo Biológico e Transmissão..... | 21 |
| 3.5 Reservatórios..... | 22 |
| 3.6 Resposta imunológica e Sinais Clínicos..... | 23 |
| 3.7 Diagnóstico..... | 24 |
| 3.7.1 Diagnóstico Parasitológico..... | 24 |
| 3.7.2 Diagnóstico Molecular..... | 25 |
| 3.7.3 Diagnóstico Sorológico..... | 26 |
| 3.8 Medidas de Controle | 28 |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 30 |
| 5. CAPÍTULO II | 36 |
| Comparação entre métodos recombinantes e PCR em Tempo Real no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina..... | 37 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 52 |
| 7. ANEXOS..... | 53 |
| Normas da Revista..... | 53 |
| Normas da Dissertação..... | 61 |

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) faz parte do grupo de enfermidades parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. É uma doença de caráter endêmico e que sua expansão geográfica está relacionada à urbanização desordenada, migração humana constante, desmatamento acentuado, adaptação do vetor (*Lutzomyia longipalpis*) a novos ecótopos e a presença do cão (*Canis familiaris*) no ambiente doméstico (ALVES e BEVILACQUA, 2004; LAINSON e RANGEL, 2005; ALVAR et al., 2012; FARIA e ANDRADE, 2012).

Os cães são considerados os principais reservatórios do protozoário, tanto em áreas urbanas quanto rurais, incriminados como fonte de transmissão da doença ao homem e a outros animais, através da picada do *L. longipalpis* (GONTIJO e MELO, 2004; WERNECK, 2010). Os animais infectados podem apresentar os sinais clínicos da doença ou permanecerem assintomáticos e em ambos os casos pode haver a presença de parasitas na pele, o que alerta para a importância desses animais como potenciais reservatórios à manutenção da infecção (MOSHFE et al., 2009).

As medidas de controle adotadas pelos órgãos de saúde são: diagnóstico e tratamento dos casos humanos, borrifação com inseticida contra o vetor e diagnóstico e eliminação dos cães positivos. Para que as medidas de controle possam ser implantadas é necessário o conhecimento prévio da distribuição e da frequência da infecção nos cães, através das avaliações sorológicas em massa. No Brasil, essas triagens não têm mostrado eficácia no controle da doença em razão dos atrasos entre a entrega dos resultados sorológicos e a eliminação dos animais sororreagentes, da baixa sensibilidade dos testes sorológicos e falta de realização do levantamento total dos animais infectados. Contudo, tem havido grandes avanços científicos quanto ao tratamento, prevenção e diagnóstico dessa doença (WHO, 2010).

O processo de eliminação de reservatórios infectados requer métodos de diagnóstico confiáveis com objetivo de evitar a eutanásia desnecessária de cães ou a permanência de animais infectados favorecendo a transmissão da doença (FERREIRA et al., 2008). O diagnóstico preciso da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é necessário para vigilância e controle da Leishmaniose Visceral Humana (LVH). O diagnóstico clínico deve ser associado ao diagnóstico laboratorial pelo fato das manifestações clínicas da doença se apresentarem de forma semelhante a outras enfermidades (GRADONI, 2002).

Diversas técnicas podem ser empregadas para diagnosticar a LVC, como os testes parasitológicos, sorológicos e moleculares. Os métodos sorológicos são os mais comumente utilizados tanto para avaliações epidemiológicas como para diagnóstico clínico. Durante muitos anos o ensaio imunoenzimático (ELISA) foi usado como teste de triagem e o teste de imunofluorescência (RIFI) como confirmatório (titulação 1:40), no entanto para a realização destes

testes são necessários equipamentos laboratoriais, fazendo com que se torne uma metodologia impraticável em nível de campo. Visando preencher esta lacuna, em 2011, o Ministério da Saúde adotou o teste imunocromatográfico TR DPP[®] para triagem nos levantamentos epidemiológicos caninos e o teste ELISA passou a ser confirmatório. O TR DPP[®] é um teste rápido qualitativo para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza uma proteína recombinante K28 (fusão das proteínas rk26, rk39 e rk9) como antígeno (QUEIROZ et al., 2010; CASTRO-JR et al., 2014).

Considerando que uma das medidas de controle seja a eliminação dos cães baseando-se no levantamento epidemiológico da população canina através dos testes sorológicos e que o teste de Imunofluorescência Indireta (RIFI), anteriormente recomendada pelo Ministério da Saúde e empregados para diagnóstico de LVC, é um teste inviável quando utilizado em nível de campo, observa-se a necessidade do desenvolvimento e avaliação de novos testes que sejam utilizados para diagnóstico e distribuídos nos laboratórios públicos. A busca por novas estratégias diagnósticas se torna importante pela necessidade em se obter um diagnóstico altamente sensível e específico, de fácil execução e que possa detectar os animais verdadeiramente infectados com o propósito de otimizar os programas de controle e com isso evitar que animais sadios sejam erroneamente eliminados ou que a doença se mantenha em contínua transmissão. Nesse sentido, faz-se necessário avaliar o teste imunocromatográfico TR DPP[®], recentemente adotado pelo Ministério da Saúde como teste de triagem no diagnóstico da LVC em relação a outras metodologias com o objetivo de determinar a sensibilidade e especificidade deste teste e os aspectos relevantes desta nova metodologia no controle da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o desempenho do teste imunocromatográfico (TR DPP[®]), do ensaio imunoenzimático (ELISA/S7[®]) e da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) para diagnóstico da leishmaniose visceral canina no Semiárido Paraibano.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar os resultados positivos entre os métodos TR DPP[®], ELISA/S7[®] e qPCR;
- Avaliar a concordância dos métodos TR DPP[®] e do ELISA/S7[®] com a qPCR e do TR DPP[®] com o ELISA/S7[®].
- Determinar a sensibilidade e especificidade do TR DPP[®], do ELISA/S7[®] e a qPCR no diagnóstico da LVC;

3. CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Epidemiologia

A LV é uma doença endêmica em quatro continentes, sendo que 90% dos casos ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. O Brasil contribui com grande parte dos casos da doença na América Latina, embora muitos deles não sejam notificados. No país, a distribuição da LV inclui diversos estados como: Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Roraima, Sergipe, São Paulo, Tocantins, Rio Grande do Sul (LAINSON e RANGEL, 2005; WERNECK, 2010; ALVAR et al., 2012).

Em alguns estados, como Pernambuco, a doença vem se expandindo devido às desordens ambientais, condições de vida desfavoráveis da população e aumento do fluxo migratório com ocupações desordenadas nas cidades (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; WERNECK, 2010).

No ano de 2012, 3.038 casos da doença em humanos foram notificados, apresentando uma incidência de 1,57 casos/100.000 habitantes e uma taxa de letalidade de 7,1%. Há alguns anos, apenas 10% dos casos ocorria em outras regiões além do Nordeste, mas em 2007, esse número atingiu cerca de 50% dos casos (WERNECK, 2010).

A importância do cão na epidemiologia da doença está relacionada a prevalência da LV, já que a doença canina é mais prevalente e de distribuição mais ampla do que a doença humana. Como forma de controle da LV, os animais infectados devem ser sacrificados, porém, ainda não há consenso entre alguns autores em relação ao sacrifício dos cães e a redução da incidência da doença em humanos (MELO, 2004).

3.2 Etiologia da LV e morfologia da *Leishmania*

Os critérios intrínsecos tais como dados imunológicos, bioquímicos e genéticos têm sido utilizados para definir as espécies de *Leishmania*. Novos métodos de detecção, isolamento e identificação genética resultaram em um grande aumento no número de espécies (BANULS et al., 2007). O agente etiológico da LV é um protozoário do gênero *Leishmania*, pertencente ao complexo *Leishmania donovani*: *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi*. A *L. donovani* é responsável pela infecção em humanos, enquanto que a *L. infantum* e *L. chagasi* causam LV tanto em humanos quanto em cães (REY, 2008). Alguns pesquisadores consideram a *L. infantum* e *L. chagasi* como sendo a mesma espécie (MARCONDES e ROSSI, 2013). A *L.*

infantum e a *L. donovani* são os agentes causadores da doença nas áreas do mar Mediterrâneo e do Oriente Médio (FRASER, 2008) e a *L. infantum* é responsável pela forma clínica da leishmaniose visceral nas Américas Central e do Sul, incluindo o Brasil (FERREIRA et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005).

O ciclo de vida da *Leishmania* é complexo por serem expostos a diferentes tipos de ambientes extracelulares e intracelulares. São parasitas digenéticos com duas fases no ciclo biológico: uma extracelular que ocorre dentro de um hospedeiro invertebrado (flebótomo) e uma fase intracelular dentro de um hospedeiro vertebrado, com duas principais formas morfológicas, amastigotas e promastigotas, que são encontradas em hospedeiros vertebrados e invertebrados, respectivamente (BANULS et al., 2007).

As formas amastigotas (Figura 1) são encontradas no interior de células do sistema fagocitário mononuclear (macrófagos e monócitos) dos hospedeiros vertebrados, principalmente em órgãos como baço, fígado, gânglios linfáticos e medula óssea. Apresenta o citossomo levemente achatado e de contorno ovóide, por vezes elíptico ou fusiforme, com núcleo grande, arredondado e excêntrico, sem flagelos e junto ao núcleo encontra-se uma estrutura denominada cinetoplasto (extensão da mitocôndria), rica em DNA mitocondrial, o kDNA. A forma flagelada ou promastigota (Figura 2), observada em cultura de células e no hospedeiro invertebrado, é alongada, com cinetoplasto localizado dentro do flagelo. O núcleo é central, formado de feixes paralelos de microtúbulos, envoltos em uma bainha citoplasmática. Essas formas infectantes podem ser cultivadas em meios de cultura de forma artificial nos laboratórios (FERREIRA et al., 2003; BASANO e CAMARGO, 2004; REY, 2008).

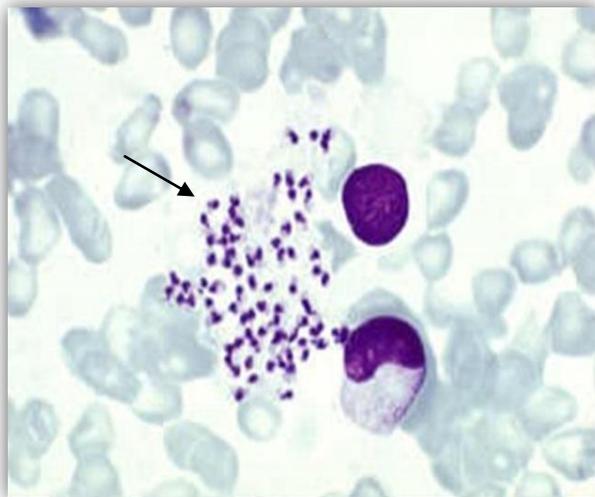


Figura 1. Forma amastigota

Fonte: <http://www.icb.usp.br/~livropar/img/capitulo5/8.jpg>



Figura 2. Forma promastigota

Fonte: Gupta e Nishi, 2011

3.3 Vetor e transmissão

O *Lutzomyia longipalpis* (Figura 3), presente nos países da América Latina, é considerado principal vetor da *L. infantum* (LAINSON e RANGEL, 2005). Estes mosquitos são dípteros da família *Psychodidae*, sub-família *Phebotominae*, conhecidos genericamente por flebotomíneos (GONTIJO e MELO, 2004).

Inicialmente acreditava-se que a LV no Brasil envolvia somente o cão e o *L. longipalpis* em um ambiente doméstico. Porém observa-se que o *L. longipalpis* é uma espécie silvestre e que ainda podem ser capturados em áreas de florestas, mesmo distante das habitações humanas (LAINSON e RANGEL, 2005).



Figura 3 - O vetor *Lutzomyia longipalpis*.

Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lutzomyia_longipalpis-sandfly.jpg

É amplamente distribuído e frequentemente encontrado em áreas peridomiciliares, intradomiciliares e em outros ecótopos. No Brasil, a distribuição do inseto *L. longipalpis* vem se expandindo resultando na adaptação do inseto tanto em ambientes rurais quanto em áreas urbanas (ANDRADE-FILHO et al., 2001). Essas mudanças ambientais têm provocado um aumento da incidência da LV em diversas áreas da região Nordeste. A espécie mais comumente encontrada nessa região é o *L. longipalpis*, embora outras espécies (*Lutzomyia evandroi*, *Lutzomyia lenti*, *Lutzomyia sallesi*) também tenham sido observadas (XIMENES et al., 2007; COSTA et al., 2013).

Estudos sobre *L. longipalpis* demonstraram que o macho produz um feromônio que atrai as fêmeas de longas distâncias. Estes insetos permanecem mais em locais ao ar livre, poucos são encontrados dentro das casas e, como a maioria dos cães dorme ao ar livre, este provavelmente é um dos fatores responsáveis pelos elevados índices de LV nos cães quando comparado ao homem (MORTON e WARD, 1989; QUINNELL e DYE, 1994a,b).

Os flebótomos são pequenos (geralmente 2 a 6 mm de comprimento por 1,5 a 3 mm de largura) com pernas longas e delgadas e o corpo densamente piloso de coloração castanho-claro (“mosquito palha”). Têm como característica o hábito de voar saltitando e pousam com as asas ligeiramente entreabertas mesmo em repouso, ao contrário dos outros dípteros. Tanto o macho quanto a fêmea necessita de carboidratos como fonte energética, porém, somente a fêmea tem hábito hematófago obrigatório devido à necessidade de sangue para o desenvolvimento dos ovos. Os machos se alimentam dos sucos de flores e plantas. O horário de maior atividade se dá ao crepúsculo vespertino, estendendo-se durante a noite. O repasto sanguíneo é realizado em várias espécies de animais vertebrados, inclusive em humanos (ANDRADE-FILHO et al., 2001; CAMARGO e BARCINSKI, 2003; BRASIL, 2006; CARDOSO, 2012).

Apesar da transmissão por flebotomíneos ser a mais importante na epidemiologia da leishmaniose, outras formas têm sido avaliadas. Alguns estudos sugerem que a doença pode ser transmitida através dos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (DANTAS-TORRES et al., 2010), transfusão sanguínea (FREITAS et al., 2006) e transmissão congênita em cães (ROSYPAL et al., 2005).

3.4 Ciclo biológico

As fêmeas da espécie *L. longipalpis* são responsáveis pela transmissão da *L. infantum*. Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro elas ingerem macrófagos infectados com as formas amastigotas do protozoário e estas se direcionam para o interior do trato digestivo. Dentro do trato digestivo anterior dos flebotomíneos ocorre o rompimento dos macrófagos liberando as amastigotas. Em seguida ocorre a multiplicação e por divisão binária se diferenciam em promastigotas e então em paramastigotas. Estas por sua vez colonizam o esôfago e a faringe do vetor e se aderem ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas. As formas infectantes são regurgitadas durante um novo repasto sanguíneo em um novo hospedeiro. No hospedeiro, as formas infectantes são liberadas na derme e são direcionadas para os órgãos linfóides secundários, ocorrendo então o processo de visceração principalmente no fígado, baço, medula óssea e linfonodos, infectando células do sistema fagocítico mononuclear como monócitos, histiócitos e macrófagos onde se transformam em amastigotas e são liberadas dos macrófagos e se dispersam pelas vias hematogênica e linfática, iniciando uma reação inflamatória e proporcionando a atração de outros macrófagos (BRASIL, 2006; REY, 2008) (Figura 4).

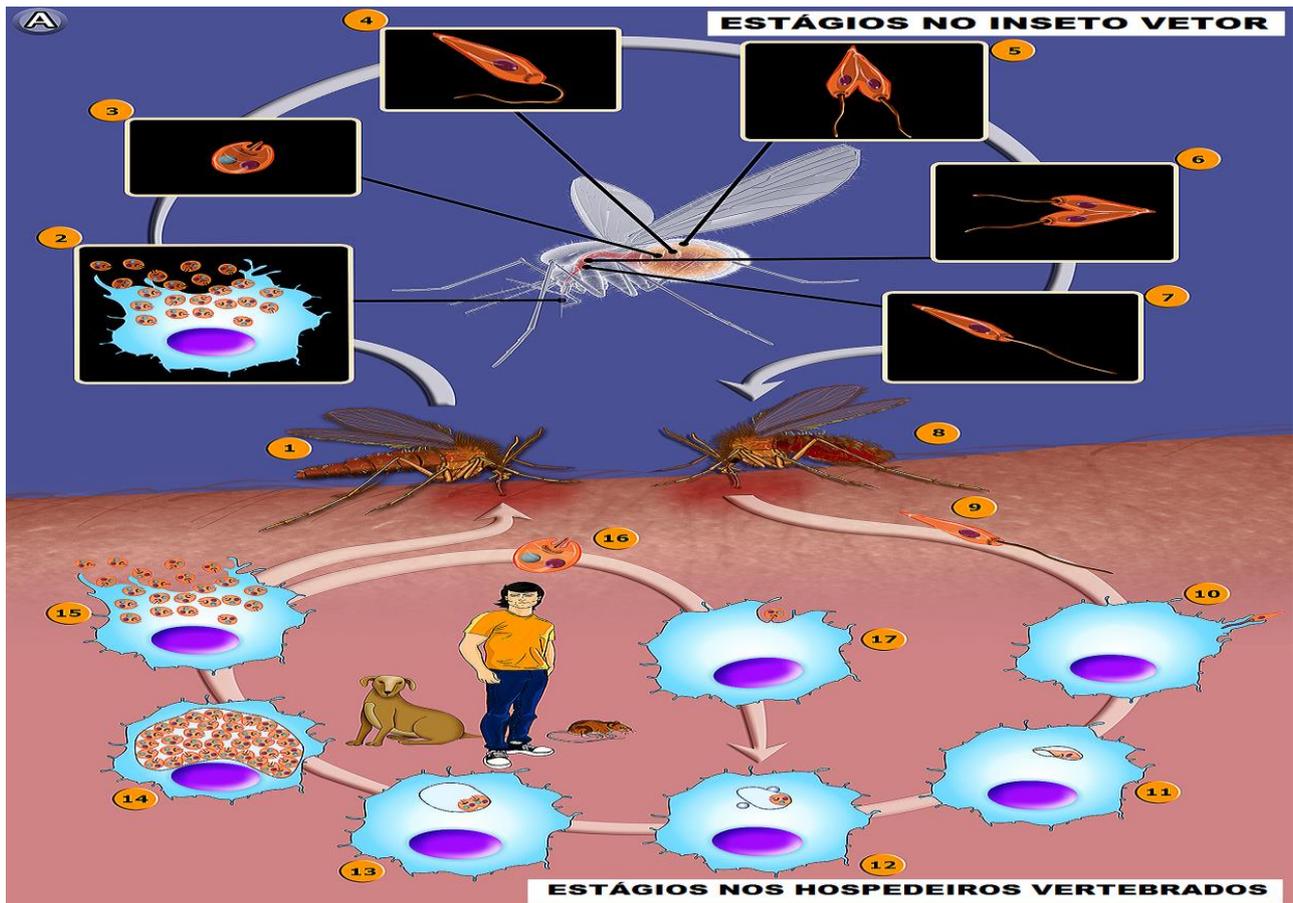


Figura 4. Ciclo biológico da leishmaniose visceral. (1) Os insetos picam o mamífero durante o repasto sanguíneo e ingerem (2) os macrófagos infectados com (3) formas amastigotas. (4) As amastigotas se transformam em promastigotas pró-cíclicas. (5) As promastigotas pró-cíclicas se multiplicam dentro do intestino médio. (6) As promastigotas migram para a válvula estomodeal do intestino médio anterior e ocorre divisão celular. (7) As promastigotas se transformam em promastigotas metacíclicas infectantes. (8) A fêmea do mosquito libera as formas promastigotas metacíclicas em um novo mamífero hospedeiro durante o repasto sanguíneo. (9) As promastigotas metacíclicas (10) infectam os macrófagos. (11) Essas formas infectantes se transformam em amastigotas. (12) As amastigotas se anexam à membrana do vacúolo parasitóforo. (13) As amastigotas se multiplicam no vacúolo. (14) Dentro do vacúolo ocorre intensa multiplicação das formas amastigotas. (15) As formas amastigotas são liberadas do macrófago (16). (17) As amastigotas liberadas infectam outros macrófagos (Adaptado de Teixeira et al., 2013).

3.5 Reservatórios

Os hospedeiros são considerados reservatórios quando participam da manutenção e disseminação do parasita na natureza e quando os parasitas são dependentes dos vetores hematófagos para sua transmissão (LAINSON e RANGEL, 2005).

A *Leishmania infantum* tem a capacidade de infectar e produzir doença em canídeos sejam eles domésticos ou silvestres, principalmente cães e raposas, considerados os principais reservatórios da doença. Os reservatórios primários para a *Leishmania* são os mamíferos silvestres (MELO, 2004; DANTAS-TORRES, 2007).

Diversos estudos avaliando reservatórios silvestres para *Leishmania* spp demonstram a presença da infecção natural no ciclo selvagem e diferentes espécies de animais já foram incriminadas como possíveis reservatórios, independente dos reservatórios domésticos, sugerindo assim a importância destes mamíferos na transmissão da doença. A dificuldade de capturar um número elevado de animais selvagens e os problemas no isolamento e identificação dos parasitas é que limita uma melhor compreensão a respeito da epidemiologia da leishmaniose e a identificação de um hospedeiro vertebrado, como reservatório natural (OLIVEIRA et al., 2005; LUPPI et al., 2008; VOLTARELLI et al., 2009).

No ambiente doméstico, os cães são considerados os principais reservatórios da doença e sua ocorrência precede os casos humanos, além disso, a prevalência da doença nos animais é mais elevada (BRASIL, 2006). A grande importância do cão como reservatório da *L. infantum* está relacionada ao fato desses animais apresentarem intenso parasitismo cutâneo e, portanto, favorecem a transmissão e disseminação da doença pelo vetor, mesmo estando aparentemente saudáveis (QUEIROZ et al., 2010).

Outras espécies domésticas já foram diagnosticadas como possíveis reservatórios, como os gatos domésticos, onde a doença já foi relatada em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (SAVANI et al., 2004; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007), cavalos (SOARES et al., 2013), além de bovinos que também já foram detectados com uma carga parasitária de *Leishmania* spp em sangue periférico (JULIÃO, 2011).

3.6 Resposta imunológica e Sinais Clínicos

Os mamíferos domésticos e os silvestres quando infectados com *Leishmania* sp pode ou não apresentar sinais evidentes de doença (WHO, 2010). Após a infecção da pele, os parasitas podem se disseminar para outros órgãos e posteriormente produzir os sinais da doença, podendo desenvolver um quadro agudo ou crônico da doença (BRASIL, 2006).

As manifestações clínicas se desenvolvem de acordo com as diferentes respostas imunológicas do animal à infecção. Estudos com camundongos sugerem que as respostas imunológicas estão relacionadas às células Th1 e Th2, demonstrando que a resposta mediada por células Th1 são responsáveis pela resolução da infecção, através da produção de INF- γ e destruição das células infectadas com os parasitas, enquanto que a proliferação de células Th2 exacerba a infecção por induzir a inibição do IFN- γ e elevar a produção de anticorpos. A produção de anticorpos leva a formação de imunocomplexos que se depositam em diversos tecidos produzindo as lesões inflamatórias, por isso que animais sintomáticos apresentam níveis mais elevados de IgG do que os assintomáticos (SOLANO et al., 2001; ROGERS et al., 2002; SILVA, 2007).

Os cães com altos índices parasitários demonstram os sinais clínicos de forma mais evidente e severa. Os sinais clínicos que podem ser associados à LVC são: linfadenomegalia, alterações cutâneas, hipertermia, perda de peso, anorexia, onicogribose, redução da imunidade, epistaxe, esplenomegalia, insuficiência renal, diarreia hemorrágica, hematúria, proteinúria, lesões ósseas, miosite, conjutivite, lesões corneais, atrofia muscular, estomatite ulcerativa, blefarite e hiperqueratose nasodigital (KOUTINAS et al., 2001; BARBIÉRI, 2006; BRASIL, 2006; MANNA et al., 2009).

3.7 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da LVC não é confiável, pois muitos animais que estão infectados são aparentemente saudáveis (assintomáticos) ou quando presentes, os sinais clínicos se assemelham aos de outras enfermidades, tornando necessária a inclusão do diagnóstico laboratorial. Atualmente há uma ampla variedade de testes diagnósticos para LVC utilizando os mais diferentes tipos de antígenos, embora nenhum apresente 100% de especificidade e sensibilidade em um mesmo teste. As técnicas diagnósticas comumente empregadas incluem microscopia e cultura das formas amastigotas, exames sorológicos e moleculares (FERRER, 1999; GRADONI, 2002; FERREIRA et al., 2008; QUEIROZ et al., 2010; FARIA e ANDRADE, 2012).

SILVA et al (2014) fazendo uma avaliação comparativa entre os vários métodos de diagnóstico para LVC, observaram que um teste apenas não é capaz de identificar de maneira adequada os cães com LVC, sendo necessário a combinação de diferentes métodos.

3.7.1 Diagnóstico parasitológico

Os testes parasitológicos baseiam-se na identificação do parasita na sua forma amastigota que pode ser realizada por esfregaço em lâmina de material biológico de baço, fígado, linfonodos e medula óssea corados pelas técnicas de Giemsa, Wright ou Leishman. Entretanto, apesar de fornecerem a certeza da infecção, pela visualização do parasito, em animais assintomáticos devido ao baixo número de amastigotas presentes nos tecidos, pode levar a resultados falso-negativos, o que torna um diagnóstico difícil e duvidoso, além de ser uma técnica muito invasiva, por ser necessária a punção de órgãos. A aspiração esplênica pode ser complicada devido ao risco de causar hemorragia. Além disso, a precisão do exame microscópico é influenciada pela experiência do técnico de laboratório e a qualidade dos reagentes. A cultura de sangue ou aspirados de órgãos aumenta a sensibilidade do diagnóstico (REY, 2008; WHO, 2010).

Estes métodos podem apresentar elevada especificidade podendo chegar a 100%, porém, a sensibilidade é bastante variável, pelo fato da distribuição do parasita nos tecidos ocorrer de forma heterogênea em torno de 50% a 83% em amostras de medula óssea e 30% a 85% em amostras de linfonodo (FERRER, 1999; GONTIJO e MELO, 2004; LAURENTI, 2009; FARIA e ANDRADE, 2012). A sensibilidade do teste parasitológico é maior em animais sintomáticos, porém não atinge 50% em casos de animais assintomáticos (MAGALHÃES et al., 2012). Os métodos parasitológicos não são adequados para estudos epidemiológicos em larga escala e até mesmo para uso em diagnósticos individuais (MELO, 2004).

3.7.2 Diagnóstico molecular

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) se apresenta como um teste de detecção rápida, sensível e específica na constatação do parasito da *Leishmania* e tem sido utilizado com finalidade diagnóstica, monitoramento do tratamento da doença e estudos epidemiológicos. A técnica baseia-se na amplificação de uma sequência de DNA do parasita através de pequenos oligonucleotídeos que se ligam especificamente a região do DNA de interesse ampliando-a em inúmeras cópias (GOMES et al., 2008; HERMONT, 2008).

Uma das grandes vantagens de realizar o diagnóstico laboratorial da LV empregando métodos baseados na PCR é o fato de não ser necessário utilizar métodos invasivos, como a biópsia de medula óssea, punção de baço, aspirado de linfonodo, biópsia de fígado ou mesmo grande volume de sangue para obtenção de material e análise (DA SILVA et al., 2004). Em relação ao exame microscópico, a detecção do DNA do parasita por PCR em sangue ou medula óssea se apresenta bem mais sensível (WHO, 2010).

A PCR em tempo real quantitativo (qPCR) permite o monitoramento contínuo da amplificação do DNA específico. A partir da quantificação do DNA molde pode se obter uma estimativa da carga relativa de parasitas em diferentes amostras. O monitoramento dos produtos de amplificação baseia-se no uso de sondas fluorescentes (MAIA e CAMPINO, 2008). A técnica de qPCR pode ser uma ferramenta útil para avaliar o papel de potenciais reservatórios domésticos e silvestres para LV. Amostras de sangue periférico podem ser utilizadas para triagem dos animais, em vez de biópsia de órgãos e tecidos que são metodologias muito invasivas. A execução da qPCR é menos trabalhosa e mais prática, além disso, pode ser automatizada permitindo a análise de grande número de amostras em estudos epidemiológicos (JULIÃO, 2011).

A sensibilidade e especificidade do teste podem variar de acordo com o método de extração de DNA utilizado, pela escolha dos oligonucleotídeos iniciadores, das amostras clínicas utilizadas, bem como do tempo da infecção (LACHAUD et al., 2002; IKONOMOPOULOS et al., 2003;

MANNA et al., 2009). CAVALCANTI et al (2009) avaliando amostras de sangue obtiveram resultados de sensibilidade e especificidade em 100% e 83,3%, respectivamente.

A vantagem em utilizar amostras de sangue periférico para PCR é que a obtenção desse tipo de material é menos invasiva em relação a outras amostras, porém, a carga parasitária no sangue normalmente é inferior ao material de medula óssea, baço ou aspirados de linfonodos, ainda mais que no sangue pode conter um número de inibidores de PCR que podem afetar a sensibilidade do teste (RETHINGHER et al., 2002).

3.7.3 Diagnóstico sorológico

Uma das características dessa doença é a grande estimulação policlonal de linfócitos B que resulta em elevada produção de anticorpos. Os testes sorológicos são os mais utilizados no diagnóstico da LVC detectando anticorpos circulantes no soro dos cães infectados. Diversos testes sorológicos podem ser utilizados: fixação de complemento, teste de aglutinação direta (DAT), imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) com diferentes modificações e western blot (FERRER, 1999). No Brasil a RIFI e o ELISA são os testes mais utilizados no diagnóstico da LV humana e canina, sendo que o ELISA tem sido o teste de escolha para inquéritos populacionais (MELO, 2004).

A RIFI é um método que utiliza como antígeno o parasita na sua forma íntegra. Entretanto, sua aplicação necessita de alto nível de habilidade, experiência e também equipamento especializado e de alto custo, além de ser muito laborioso o que dificulta a sua utilização na triagem de um grande número de amostras (FARIA e ANDRADE, 2012).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) baseia-se na reação de anticorpos presentes no soro com o antígeno de *Leishmania* adsorvido em microplacas, cuja reação final é medida por espectrofotometria. A sensibilidade e a especificidade do ELISA podem variar dependendo do tipo de antígeno empregado. Os testes que utilizam o antígeno bruto sejam com promastigotas, amastigotas ou mesmo com extrato solúveis de ambas ou alterações nos protocolos padrões experimentais (por exemplo, o tempo de incubação ou do tipo de microtitulação das placas usadas), limitam a especificidade do teste (REITHINGER et al., 2002; MAIA e CAMPINO, 2008).

O uso da tecnologia do DNA recombinante tem permitido a clonagem molecular de diversos genes que codificam proteínas antigênicas de *Leishmania* que podem ser usadas no desenvolvimento de métodos específicos para o sorodiagnóstico (MAIA e CAMPINO, 2008). ROSÁRIO et al (2005) analisando diferentes tipos de antígenos no teste ELISA obtiveram um resultado que variou entre 97-100% para sensibilidade e 88-100% de especificidade.

Existe no mercado um teste sorológico para diagnóstico da LVC que emprega uma proteína recombinante derivada da HSP70, o ELISA/S7[®], porém o resultado fornecido por esse teste ainda não é reconhecido pelo Ministério da Saúde, apesar de ser reconhecido e aprovado pela FUNED e o kit ser registrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento que é o órgão que regulamenta todos os produtos de uso veterinário. Esse kit tem como base um peptídeo recombinante, produzido por engenharia genética, que permite a detecção de anticorpos na fase mais precoce da infecção.

No Brasil, atualmente os testes preconizados pelo Ministério da Saúde para levantamentos epidemiológicos e controle da LVC, são o teste imunocromatográfico - TR DPP[®] como teste de triagem e ELISA como teste confirmatório (BRASIL, 2011).

Os testes imunocromatográficos são importantes ferramentas para o diagnóstico sorológico da LVC devido à rapidez e praticidade do teste, tanto para uso nas condições de campo quanto para pesquisas. Estes testes permitem o processamento de um grande número de amostras de forma rápida quando comparado à microscopia, ELISA ou PCR e não exige qualificação técnica para realização do procedimento ou equipamentos laboriosos (OTRANTO et al., 2005).

O teste rápido imunocromatográfico foi desenvolvido pela Chembio Diagnostic Systems, Inc. (Medford, Nova Iorque, EUA) que agora é fabricado como Dual-Path Plataforma (TR DPP[®]) Teste Rápido para Leishmaniose Visceral (Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) (GRIMALDI-JR et al., 2012). Esta tecnologia utiliza uma proteína recombinante produzida a partir de um gene clonado de *Leishmania infantum* e que contém uma repetição de 39 aminoácidos conservados entre as espécies viscerotrópicas de leishmania (*Leishmania donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*). Uma metodologia inovadora que emprega uma combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal imunocromatográfico capaz de detectar anticorpos contra a proteína K28 (FUNED, 2013; CASTRO-JR et al., 2014). O teste TR DPP[®] aderido a antígenos recombinantes mostra-se um bom indicador da LVC, além de ser um procedimento simples, de fácil execução, rápido e adaptado para uso tanto no laboratório quanto em campo (SANTIS et al., 2013).

No entanto, os resultados de sensibilidade e especificidade apresentam valores entre 47-62% e 87-96%, respectivamente. A sensibilidade de um teste de diagnóstico é provável mudar durante o curso clínico de infecção, dependendo do hospedeiro e variabilidade genética de respostas imunitárias específicas (GRIMALDI JR et al., 2012., SANTIS et al., 2013). Este teste é um método razoável para confirmação de infecção em casos clínicos suspeitos e baixa sensibilidade para detectar cães infectados assintomáticos, porém como teste de triagem permite uma remoção mais rápida dos reservatórios sintomáticos infectados impedindo a transmissão do parasita (SILVA et al., 2014). Além disso, apresenta-se como um teste de baixo custo simples e rápido em relação a outros métodos de diagnóstico, cujos resultados são demorados e as metodologias são de elevado custo

quando realizada em larga escala. Em áreas endêmicas se faz necessária à disponibilidade de um método diagnóstico rápido e de fácil manuseio, como o teste imunocromatográfico, para realização dos programas de controle da leishmaniose (LIMA et al., 2010).

3.8 Medidas de Controle

O programa de controle para LV no Brasil incluem a eutanásia de cães infectados, entretanto o que se observa é que essa estratégia não conseguiu impedir o aumento de casos caninos e humanos. Uma ferramenta de diagnóstico rápido, sensível e específico se torna necessária para auxiliar e agilizar as intervenções de controle (REITHINGER et al., 2002). Outras medidas também fazem parte do programa como tratamento dos casos humanos, controle de vetores flebotômicos, ou eliminação de outros animais que também possam ser considerados como reservatórios (ASHFORD et al., 1998).

As linhas investigativas na busca por novos métodos e novas tecnologias que promovam a eficiência das medidas de vigilância e de controle se direcionam para os programas de implementação de laboratórios de diagnóstico humano e canino, tratamento de pacientes com leishmaniose visceral, avaliação dos vetores e estratégias para controle do reservatório (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

Em áreas endêmicas da LV no Brasil, para que as medidas de controle possam ser iniciadas, a avaliação da distribuição e frequência da infecção em cães deve ser determinada. A triagem em massa de cães domésticos geralmente é feita através de exames sorológicos (ASHFORD et al., 1998; WHO, 2010).

Os programas de controle devem ser voltados tanto para os animais assintomáticos quanto sintomáticos, de maneira contínua e em longo prazo, já que muitas vezes o sacrifício indiscriminado de cães assintomáticos com diagnóstico positivo podem não ter eficiência esperada se forem utilizados testes com baixa especificidade. Pela inexistência ou falta de implementação de outras medidas que impeçam a transmissão da doença, é que se tornam necessárias a realização de inquéritos epidemiológicos caninos e eutanásia dos cães soropositivos. Porém, a eutanásia dos animais deve ser realizada de maneira planejada, precisa e de forma responsável, não como uma medida mecânica em grande escala (BISUGO et al., 2007; COSTA et al., 2013).

O controle do reservatório da LVC é algo complexo, pois o sacrifício dos cães envolve não somente questões de saúde, meio ambiente, conservação, mas principalmente a questão afetiva, já que muitos proprietários escondem seus animais durante as medidas de controle por não aceitarem que seus animais aparentemente saudáveis (porém sorologicamente positivos) sejam condenados à

morte. Outro problema observado é o grande número de animais abandonados (LAINSON e RANGEL, 2005).

A remoção de animais infectados pode afetar a transmissão da doença, onde a eutanásia de cães soropositivos pode resultar em uma possível redução na incidência tanto da LVC quanto da LVH. Porém o que se observa é que mesmo realizando o sacrifício dos cães, a doença continua sendo transmitida, sugerindo a possibilidade de outros reservatórios silvestres ou até mesmo outros mamíferos domésticos estarem envolvidos na transmissão ou que os métodos sorológicos não sejam capazes de detectar todos os animais infectados (ASHFORD et al., 1998).

Os medicamentos humanos não devem ser utilizados para o tratamento da LVC por causa de sua baixa eficácia parasiticida neste hospedeiro e que poderia ocasionar uma resistência potencial do parasita (WHO, 2010).

No Brasil, algumas vacinas licenciadas pelo Ministério da Agricultura são comercializadas para imunização de cães para prevenção da LVC, no entanto, essas vacinas ainda estão sendo avaliadas (FERNANDES et al., 2014).

A população deve ser orientada sobre a posse responsável de cães, cujo objetivo é promover ações de conscientização para adoção de medidas que resultem no bem-estar animal a fim de evitar o abandono e maus tratos, fatores estes que contribuem com a expansão das zoonoses, como a leishmaniose visceral (SANTOS et al., 2014).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUSA-ATTA, M. L. B.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E. A.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 227–232, 2005.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. doer. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos one**, v. 7, p. 1-12, 2012.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p.259-265, 2004.
- ANDRADE-FILHO, J. D.; VALENTE, M. B.; ANDRADE, W. A.; BRAZIL, R. P.; FALCÃO, A. L. Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 4, p. 323-329, 2001.
- ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, M. C.; SAMPAIO, D. P.; BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 53–57, 1998.
- BANULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in Parasitology**, v. 64, n. 1, p. 1-113, 2007.
- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 329–337, 2006.
- BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.
- BISUGO, M. C.; ARAÚJO, M. F. L.; TANIGUCHI, H. H.; ACUNHA, E.; SANTOS, A. A.; PESSOTO JUNIOR, M.; KANETO, C. N.; VO CAMARGO, C.; POLIZEL, M. A.; VIGILATO, M. A. N.; NEGREIROS, C. M. S.; OKAGIMA, M.; GONÇALVES, N. M.; LUNDSTEDT, L. P.; ANDRADE, A. M.; LIMA, V. M. F.; TOLEZANO, J. E. 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, p. 185-193, 2007.
- BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1. ed., série A, Normas e Manuais Técnicos, Brasília-DF, 2006, 62 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota Técnica: Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde**. UVR/CGDT/DEVEP/SVS/MS, Brasília, p.1-5, 2011.
- CAMARGO, L. M.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003.

CARDOSO, S. P. **Leishmaniose visceral canina (LVC): Revisão de literatura e estudo comparativo entre as técnicas de citopatologia, histopatologia e imuno-histoquímica no diagnóstico da LVC em cães naturalmente infectados do Distrito Federal (DISSERTAÇÃO DE MESTRADO)**, BRASÍLIA, 2012, 69 p.

CASTRO-JÚNIOR, J. G.; FREIRE, M. L.; CAMPOS, S. P. S.; SCOPEL, K. K. G.; PORROZZI, P.; DA SILVA, E. D.; COLOMBO, F. A.; SILVEIRA, R. C. V.; MARQUES, M. J.; COIMBRA, E. L. 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 de São Paulo**, v. 56, n. 3, p. 225-229, 2014.

CAVALCANTI, M.P.;BRITO, M.E.F.;SOUZA,W.V. et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. *The Veterinary Journal*, v.182, p.356-358, 2009.

COSTA, P. L.; DANTAS-TORRES, F.; SILVA, F. J.; GUIMARÃES, V. F. V.; GAUDÊNCIO, K.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 126, p. 99-102, 2013.

DA SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.; PACHECO, R. S.; BRAZIL, R. P. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 251-257, 2004.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.

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

DANTAS-TORRES, F.; LORUSSO, V.; TESTINI, G.; DE 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. **Parasitology Research**, v. 106, n.4, p.857-860, 2010.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.

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

FERREIRA, M. U.; FORONDA, A. S.; SCHUMAKER, T. T. S. O gênero *Leishmania* e as leishmanioses. In: **Fundamentos da Parasitologia Humana**, Manole, Barueri, São Paulo, 1. ed., c. 5, p. 37-46, 2003.

FERNANDES, C. B.; MAGALHÃES JUNIOR, J. T.; DE JESUS, C.; SOUZA, B. M. P. S.; LARANGEIRA, D. F.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T.; BARROUIN-MELO, S. M. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas:

IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine**, v. 32, p. 1287–1295, 2014.

FERREIRA, S.; ITUASSU L.; MELO, M.; ANDRADE, A. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR–hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 257-263, 2008.

FRASER, C. M. **Manual Merck de Veterinária: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para veterinária**. 9 ed. São Paulo: Roca, p. 543-544, 2008.

FREITAS, E.; MELO, M.N.; COSTA-VAL, A.P.; MICHALICK, M.S.M. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 159-167, 2006.

FUNED. **Avaliação da Qualidade do TR DPP® no Campo**. Manual, Novembro, 2013, p. 20.

GOMES, Y. M. A.; CAVALCANTI, M. P.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, v. 175, p. 45–52, 2008.

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

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: **Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum**, Sevilla, Spain, p. 7-14, 2002.

GRIMALDI JR, G.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; SANTOS, C. B.; PINTO, I. S.; DE-AZEVEDO, C. T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 54–59, 2012.

GUPTA, S.; NISHI. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. **Indian Journal of Medical Research**, v. 133, n. 1, p. 27–39, 2011.

HERMONT, V. J. **Leish-Tec**. Vacina Recombinante contra Leishmaniose Visceral Canina. Manual Técnico, 1. ed., 2008.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M. et al. Diagnóstico molecular de leishmaniose em cães: aplicação comparativa dos métodos tradicionais de diagnóstico e no teste proposto em amostras clínicas. **Veterinary Parasitology**, n.113, p.99-113, 2003.

JULIÃO, F. S. **Uso de método de biologia molecular quantitativo (PCR Real-Time) na avaliação de reservatórios para leishmaniose visceral**. Bahia, 2011, 84 f, Tese (DOUTORADO) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz.

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. **Veterinary Parasitology**, v. 98, p. 247–261, 2001.

- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-827, 2005.
- LACHAUD, L.; MARGCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DREREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.
- LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 67, p. 13-23, 2009.
- LIMA, V. M. F.; FATTORI, K. R.; MICHELIN, A. F.; NETO, L. N.; VASCONCELOS, R. O. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 330-333, 2010.
- LUPPI, M. M.; MALTA, M. C. C.; SILVA, T. M. A.; SILVA, F. L.; MOTTA, R. O. C.; MIRANDA, I.; ECCO, R.; SANTOS, R. L. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 55, n. 1/2, p. 146-151, 2008.
- MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J. M. ; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.
- MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 274-287, 2008.
- MAGALHÃES, L. F.; WILSON, T. M.; MEDEIROS, A. A. Quadro clínico de cães com leishmaniose visceral e sua correlação com a sensibilidade do teste parasitológico. **Veterinária Notícias**, v. 18, n. 2, p. 67-72, 2012.
- MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; GRAVINO, A. E. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 76-78, 2009.
- 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.
- MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUÑOZ-PÉREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 267-273, 2007.
- MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, suplemento 1, p. 41-45, 2004.
- MORTON, I. E.; WARD, R. D. Laboratory responses of female *Lutzomyia longipalpis* sandflies to a host and male pheromone source over distance. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 3, p. 219-223, 1989.
- MOSHFE, A.; MOHEBALI, M.; EDRISSIAN, G.; ZAREI, Z.; AKHOUNDI, B.; KAZEMI, B.; JAMSHIDI, S.; MAHMOODI, M. Canine visceral leishmaniasis: Asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. **Acta Tropica**, v. 112, p. 101-105, 2009.

OLIVEIRA, F. S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M. Q.; BRAZIL, R. P.; PACHECO, R. S. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 219-227, 2005.

OTRANTO, D.; PARADIES, P.; SASANELLI, M. T.; LEONE, N.; CAPRARIIS, D.; CHIRICO, J.; SPINELLI, J.; CAPELLI, G.; BRANDONISIO, O. Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. **Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 32-37, 2005.

QUEIROZ, N. M. G. P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; MACHADO, R. Z.; CÁRIS M.; NUNES, C. M.; STARKE-BUZETT, W. A. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010.

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

QUINNELL, R. J.; DYE, C. Correlates of the domestic abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Amazonian Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 8, p. 219-224, 1994b.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. R. 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.

REY, L. *Leishmania e Leishmaníases: Os Parasitos*. In: **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 4. ed., 2008, 883p.

ROGERS, K. A.; DEKREY, G. K.; MBOW, M. L.; GILLESPIE, R. D.; BRODSKYN, C. I.; TITUS, R. G. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, p. 1-7, 2002.

ROSÁRIO, E. Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA R. T.; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 197-203, 2005.

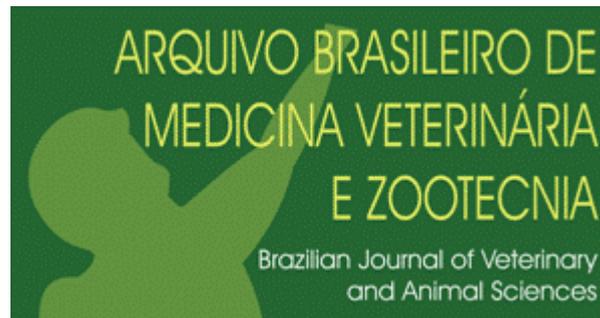
ROSYPAL, A. C.; TROY, G. C.; ZAJAC, A. M.; FRANK, G.; LINDSAY, D. S. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970-972, 2005.

SANTIS, B.; SANTOS, E. G. B.; SOUZA, C. S. F.; CHAVES, S. A. M. Performance of DPP™ immunochromatographic rapid test (IRT) for canine visceral leishmaniasis: comparison with other serological methods in suspected dogs from Cuiabá, Mato Grosso State, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 3, p. 198-205, 2013.

SANTOS, F. S.; TÁPARO, C. V.; COLOMBO, G.; TENCATE, L. N.; PERRI, S. H. V.; MARINHO, M. Conscientizar para o bem-estar: posse responsável. **Revista Ciência em Extensão**, v. 10, n. 2, p. 65-73, 2014.

- SAVANI, E. S. M. M.; Camargo, M. C. G. O.; CARVALHO, M. R. C.; ZAMPIERI, R. A.; SANTOS, M. G.; D'ÁURIA, S. R. N.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 120, p. 229–233, 2004.
- SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Tópica**, v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.
- SILVA, D. T.; STARKE-BUZETTI, W. A.; ALVES-MARTIN, M. F.; PAIXÃO, M. S.; TENÓRIO, M. S.; LOPES, M. L. M. Comparative evaluation of several methods for canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 179-186, 2014.
- SOARES, I. R.; SILVA, S. O.; MOREIRA, F. M.; PRADO, L. G.; FANTINI, P.; MARANHÃO, R. P. A.; SILVA-FILHO, J. M.; MELO, M. N.; PALHARES, M. S. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmaniainfantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 665–669, 2013.
- SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGO, M.; VALLADARES, J. E.; FISA, R.; CASTILLEJO, S.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; ARBOIX, M.; PORTÚS, M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 265-276, 2001.
- TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA, P. F. P.; WANDERLEY, S. The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. **Plos Pathogens**, v. 9, p. 1-4, 2013.
- VOLTARELLI, E. M.; ARRAES, S. M. A. A.; PERLES, T. F.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T. G. V. Serological survey for *Leishmaniasp.* Infection in wild animals from the municipality of Maringá, Paraná state, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical**, v. 915, n. 4, p. 732-744, 2009.
- XIMENES, M. F. F. M.; SILVA, V. P. M.; QUEIROZ, P. V. S.; REGO, M. M.; CORTEZ, A. M.; BATISTA, L. M. M.; MEDEIROS, A. S.; JERONIMIO, S. M. B. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e Leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil - Reflexos do Ambiente Antrópico. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 1, p. 128-137, 2007.
- WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n.4, p. 644-645, 2010.
- WHO. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**, Geneva, 2010, 186 p.

5. CAPÍTULO II



ISSN 0102-0935

**O ARTIGO SERÁ SUBMETIDO – ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA**

**Comparação entre métodos recombinantes e PCR em Tempo Real no diagnóstico da
Leishmaniose Visceral Canina**

1 **Comparação entre métodos recombinantes e PCR em Tempo Real no diagnóstico**
2 **da Leishmaniose Visceral Canina**

3 Comparative between recombinant methods and Real-Time PCR in diagnosis of Canine
4 Visceral Leishmaniasis

5 G.D. Nóbrega^{1*}, R.B.S. Silva², T.S. Oliveira-Neto³, C.P.S. Ramos⁴, M.A. Melo², P.P.
6 Andrade¹, J.L. Lima-Filho¹

7 ¹Universidade Federal de Pernambuco – Recife, PE

8 ²Universidade Federal de Campina Grande – Patos, PB

9 ³Universidade Federal da Paraíba – Areia, PB

10 ⁴Universidade de Pernambuco – Recife, PE

11 *Autor para correspondência: gil_nobrega@hotmail.com

12
13 **RESUMO**

14
15 A leishmaniose visceral (LV) é uma doença grave que resulta em problemas à saúde
16 pública, por ser se tratar de uma zoonose. Os cães são os principais reservatórios
17 domésticos do protozoário e funcionam como indicadores da ocorrência dessa doença
18 em humanos. Uma das recomendações feitas pelo Ministério da Saúde para controle da
19 doença em humanos é triagem e sacrifício dos animais sorologicamente positivos para
20 leishmaniose visceral canina (LVC). Porém, o diagnóstico ainda é um problema no
21 Brasil. O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar dois testes sorológicos que
22 utilizam como antígeno proteínas recombinantes, sendo um teste rápido (TR DPP[®])
23 com a proteína rk26/rk39/rk9 e um ensaio imunoenzimático (ELISA/S7[®]) com HSP70 e
24 um teste molecular, a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para
25 diagnóstico da LVC. Foram utilizadas 258 amostras de soro e sangue total divididas em
26 dois grupos, sendo 212 animais assintomáticos e 46 animais sintomáticos, baseando-se
27 nos sinais clínicos, obtidos durante um levantamento epidemiológico no Semiárido
28 Paraibano. Os resultados mostraram que do total das amostras 32,9% (85/258) foram
29 positivas em pelo menos um teste, sendo 29,2% (62/212) dos animais assintomáticos e
30 50,0% (23/46) dos animais sintomáticos. Os melhores resultados de concordância entre
31 os testes foram obtidos quando realizada a comparação entre a qPCR e o ELISA/S7[®]

32 mostrando que para animais assintomáticos a sensibilidade e especificidade foi de 74%
33 e 93% respectivamente e coeficiente *Kappa* de 0,58. Para os animais sintomáticos, a
34 sensibilidade foi de 80% e 81% de especificidade com coeficiente *Kappa* de 0,51,
35 revelando moderada concordância em ambos os grupos. Com base nos resultados, o
36 ELISA/S7[®] apresentou o melhor desempenho entre os testes, embora o TR DPP[®] seja
37 um teste de fácil execução e rápido diagnóstico.

38 **Palavras-chave:** leishmaniose visceral canina, diagnóstico, teste imunocromatográfico,
39 ensaio imunoenzimático e qPCR.

40

41

ABSTRACT

42

43 Visceral leishmaniasis (VL) is a serious disease that results in public health problems,
44 being it is a zoonosis. Dogs are the main domestic reservoirs of the parasite and act as
45 indicators of the occurrence of this disease in humans. One of the recommendations
46 made by the Ministry of Health to control the disease in humans is screening and
47 sacrifice of serologically positive animals for canine visceral leishmaniasis (CVL).
48 However, the diagnosis is still a problem in Brazil. The aim of this study was to
49 evaluate and compare two serological tests using recombinant proteins as antigens, and
50 a quick test (TR DPP[®]) with protein rk26/rk39/rk9 and an enzyme-linked
51 immunosorbent assay (ELISA/S7[®]) with HSP70 and a test molecular, the Polymerase
52 Chain Reaction in Real Time (qPCR) for the diagnosis of CVL. 258 samples of serum
53 and whole blood were used divided into two groups, with 212 asymptomatic animals
54 and 46 symptomatic animals, based on clinical signs, obtained during an
55 epidemiological survey in semi-arid region of Paraíba. The results showed that the total
56 of the samples 32.9% (85/258) were positive in at least one test, 29.2% (62/212) of
57 asymptomatic animals and 50.0% (23/46) of symptomatic animals. The best results of
58 correlation between the tests performed were obtained when comparing the qPCR and
59 ELISA/S7[®] showing that asymptomatic animals for sensitivity and specificity was 74%
60 and 93% respectively and Kappa coefficient of 0.58. In symptomatic animals, the
61 sensitivity was 80% and specificity of 81% with a Kappa coefficient of 0.51, showing
62 moderate agreement in both groups. Based on the results, the ELISA/S7[®] showed the

63 best performance among the tests, although the TR DPP[®] a test is easy to perform and
64 rapid diagnosis.

65 **Keywords:** canine visceral leishmaniasis, diagnosis, immunochromatographic test,
66 immunoenzymatic assay and qPCR.

67

68

INTRODUÇÃO

69

70 A leishmaniose visceral (LV) atinge cerca de 65 países, com incidência estimada
71 em 500 mil novos casos humanos e 59 mil óbitos anuais, onde mais de 90% dos casos
72 ocorrem em Bangladesh, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil (Alvar et al.,
73 2012; Who, 2010). No Brasil, a doença é considerada endêmica na região Nordeste
74 (Almeida et al., 2005). Inicialmente era considerada como uma doença rural, porém o
75 que se observa é uma expansão da LV para os ambientes urbanos, chegando a atingir os
76 grandes centros (Missawa et al., 2011). O agente etiológico responsável pela doença é o
77 protozoário *Leishmania infantum chagasi* (Werneck, 2010) transmitido principalmente
78 pelos flebotomíneos, *Lutzomyia longipalpis*, durante o repasto sanguíneo nos
79 hospedeiros (Missawa et al., 2011). O cão é o principal reservatório doméstico e a
80 existência da leishmaniose canina é determinada por um número de fatores
81 epidemiológicos que facilitam o acesso entre os vetores e o hospedeiro vertebrado
82 (Gontijo e Melo, 2004).

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

Como forma de controlar a LV, o Ministério da Saúde preconiza que as medidas
devem priorizar o diagnóstico e tratamento dos casos humanos, controle dos insetos que
transmitem a doença, informações sobre a saúde educacional e detecção e eutanásia dos
cães infectados (Who, 2010). Para que tais medidas sejam aplicadas, são necessárias
avaliações sorológicas para determinação dos cães infectados com a LVC, que antes
eram realizadas através do teste padrão RIFI (titulação $\geq 1:40$ - considerados
infectados). Por conta dos problemas gerados por resultados falso-negativos e falso-
positivos neste teste, a partir de 2011 uma nova metodologia diagnóstica foi
estabelecida para ser implantada nos serviços de saúde para diagnóstico da LVC,
utilizando um teste imunocromatográfico como teste de triagem e ELISA como teste
confirmatório (Brasil, 2011). O teste imunocromatográfico (TR DPP[®], Bio-
Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) desenvolvido pela Chembio Diagnostic

95 Systems, Inc. (Medford, Nova Iorque, EUA) vem sendo utilizado como teste de triagem
96 no diagnóstico da LVC nos serviços de saúde. É uma nova metodologia que utiliza uma
97 proteína recombinante capaz de detectar anticorpos contra a fusão das proteínas
98 k26/k39/k9. No entanto, os resultados de sensibilidade e especificidade apresentam
99 valores entre 47-62% e 87-96%, respectivamente (Grimaldi-Jr et al., 2012; Santis et al.,
100 2013; Castro-Junior et al., 2014).

101 O ELISA (Enzyme Linked Immunossorbent Assay) detecta anticorpos anti-
102 *Leishmania*, sendo muito útil principalmente na realização de levantamentos
103 soropidemiológicos devido suas qualidades de praticidade, ser menos oneroso e
104 resultado rápido. Valores de sensibilidade e especificidade se apresentam de forma
105 bastante variada, conforme o tipo de antígeno utilizado sejam eles antígenos totais ou
106 recombinantes com valores entre 97-100% para sensibilidade e 88-100% de
107 especificidade (Rosário et al., 2005). O teste ELISA/S7[®] é um método diagnóstico
108 desenvolvido pela Biogene (Recife, PE) que também utiliza como antígeno uma
109 proteína recombinante derivada da HSP70, porém o resultado fornecido por esse teste
110 ainda não é reconhecido pelo Ministério da Saúde, embora seja registrado pelo
111 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Faria e Andrade, 2012).

112 A PCR quantitativa em tempo real permite a amplificação monitorada de uma
113 sequência de DNA específica do parasita, baseada no uso de sondas fluorescentes, que
114 pode ser obtida de diferentes amostras. Os benefícios desta metodologia incluem a
115 redução dos riscos de contaminação e consequentemente redução de falso-positivos. A
116 sensibilidade da PCR pode apresentar diferentes resultados, dependendo da amostra
117 avaliada, isso porque a distribuição dos parasitas nos diversos tecidos se apresenta de
118 forma heterogênea resultante do tropismo da cepa ao tecido e dependendo da resposta
119 imune local (Maia e Campino, 2008; Cavalcanti et al., 2009; Faria e Andrade, 2012).

120 O sucesso dos programas de controle da LV depende da detecção e eutanásia dos
121 cães verdadeiramente positivos através de métodos diagnósticos confiáveis, porém as
122 diferentes metodologias apresentadas mostram grandes variações quanto aos resultados.
123 Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar o desempenho de dois métodos com
124 diferentes tipos de proteínas recombinantes, o teste imunocromatográfico (TR DPP[®] -
125 Bio - Manguinhos) e o ensaio imunoenzimático (ELISA/S7[®] - Biogene) com a reação

126 em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para diagnóstico da LVC no Semiárido
127 Paraibano.

128

129 **MATERIAIS E MÉTODOS**

130

131 Foram utilizadas 258 amostras de soro e sangue total de animais acima de seis
132 meses, selecionadas de um levantamento epidemiológico feito durante o mês de maio de
133 2014 no Semiárido Paraibano. As amostras foram divididas em dois grupos: 212
134 amostras de animais assintomáticos e 46 de animais sintomáticos. Os principais sinais
135 utilizados para classificação dos grupos foram: onicogribose, perda de peso, lesões de
136 pele, alopecia, apatia e lesões oculares (Manna et al., 2009). Os exames sorológicos
137 realizados foram o teste rápido (TR DPP[®] - Leishmaniose Visceral Canina -
138 Biomanguinhos, Rio de Janeiro) e o ensaio imunoenzimático (ELISA/S7[®] - Biogene,
139 Recife) com a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

140 O teste imunocromatográfico - TR DPP[®] foi realizado de acordo com as
141 instruções do fabricante, sendo adicionados 5 µL de plasma ao 1º poço (AMOSTRA +
142 TAMPÃO) e duas gotas do tampão. Após 5 minutos quatro gotas do tampão foram
143 adicionadas ao 2º poço (TAMPÃO) e esperou-se 10 minutos a Temperatura Ambiente.
144 Os resultados dos testes foram feitos pela leitura visual. As amostras foram consideradas
145 reagentes quando duas linhas testes (Controle - C e outra na área Teste - T) foram
146 detectadas e não reagentes quando apenas a linha Controle - C foi detectada.

147 Para o ELISA/S7[®] os soros utilizados como controle negativo e positivo foram
148 fornecidos no Kit e os soros em teste foram previamente diluídos (1:100) em solução de
149 diluição por 12 horas a 4°C. Em seguida os soros diluídos previamente foram
150 distribuídos na placa de 96 poços sensibilizada com o antígeno. Aguardava-se 30
151 minutos e lavava-se a placa três vezes com Tampão Fosfato de Sódio com 0,05 % de
152 tween 20 (PBST), em seguida distribuía o conjugado na placa e esperava-se 30 minutos
153 a temperatura ambiente. A placa foi lavada por mais três vezes com Tampão Fosfato de
154 Sódio (PBS). A solução de revelação era adicionada aos poços e a placa era incubada
155 por 20 minutos em local escuro. Por fim, eram despejadas duas gotas por poço de
156 solução de parada e os resultados obtidos em valores avaliados por densidades ópticas
157 (D.O.) feitas no leitor de ELISA a $\lambda = 450$ nm. O ponto de corte foi calculado entre as

158 médias aritméticas das D.O. dos soros controles não reagentes e somadas ao fator
159 $R=0,142$. Para determinação da amplitude da zona cinza (faixa de indeterminados)
160 subtraía-se 0,03 do ponto de corte. Todas as etapas foram realizadas conforme descrito
161 pelo fabricante.

162 As amostras de sangue tiveram seu DNA extraído adicionando-se 1mL de
163 Brazol para cada 300 μ L de sangue total. Em seguida os tubos foram agitados por 2
164 minutos em vórtex e 250 μ L de clorofórmio gelado foram adicionados aos tubos e
165 novamente foram agitados. Após agitação as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g
166 a 4°C, por 20 minutos e o sobrenadante foi então transferido para novos tubos contendo
167 500 mL de etanol absoluto gelado. Os tubos foram agitados por inversão durante 2
168 minutos e novamente centrifugados a 12.000 x g a 4°C, durante 15 minutos. O
169 sobrenadante foi desprezado por aspiração com cautela para não eliminar o *pellet*. O
170 *pellet* formado foi lavado com 500 mL de etanol 70%, homogeneizado por inversão e
171 centrifugado a 12.000 x g a 4°C, durante 10 minutos (2x). O sobrenadante foi
172 desprezado e o *pellet* foi dissolvido em tampão TRIS-EDTA 1X estéril. Logo após a
173 extração, a concentração de DNA (μ g/mL) das amostras e o grau de pureza (coeficiente
174 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$) foram verificados em fotômetro (BioPhotometer plus Eppendorf) e o
175 DNA foi armazenado a -20° C até a realização da qPCR.

176 A PCR em tempo real foi feita usando o termociclador da Bioer Technology.
177 Primers específicos foram sintetizados de acordo com Cavalcanti et al. (2009) (Linf.1-
178 23F: 5'-TCCCAAACCTTTTCTGGTCCT-3') e (Linf.1-154R: 5'-
179 TTACACCAACCCCCAGTTTC-3') para amplificar um fragmento de 132 pb
180 (Temperatura de melting a 81°C). Reações de 13 μ l incluindo 2 μ l de DNA das
181 amostras, 1 mM de cada primer e 6 μ l de SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen). A reação foi
182 realizada usando uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguida de
183 40 ciclos de amplificação (95°C/15 s, 60°C/1 min). Controles positivos e negativos
184 contendo ou não o DNA de isolados de cultura de *Leishmania* spp. foram incluídos. O
185 software usado para a análise dos resultados foi o LineGeneK (versão 4.2.00).

186 Os resultados de positividade dos dois testes sorológicos (ELISA/S7[®] e TR
187 DPP[®]) e do teste molecular qPCR foram expressos em porcentagem. As análises
188 comparativas dos exames diagnósticos foram realizadas pelo Índice *Kappa* de
189 concordância, para o intervalo de confiança de 95%, através do programa *Dag Stat* em

190 planilha do programa Microsoft Excel (Mackinnon, 2000). A concordância nos
 191 diagnósticos sorológicos foi calculada conforme classificação de Thursfield (2007) de
 192 acordo com os valores do índice *Kappa* (k) considerando os níveis de comparação: 0,81
 193 a 0,99: concordância quase perfeita; 0,61 a 0,8: concordância substancial; 0,41 a 0,6:
 194 concordância moderada; 0,21 a 0,4: concordância razoável; 0,1 a 0,2: concordância
 195 fraca; <0: concordância pobre.

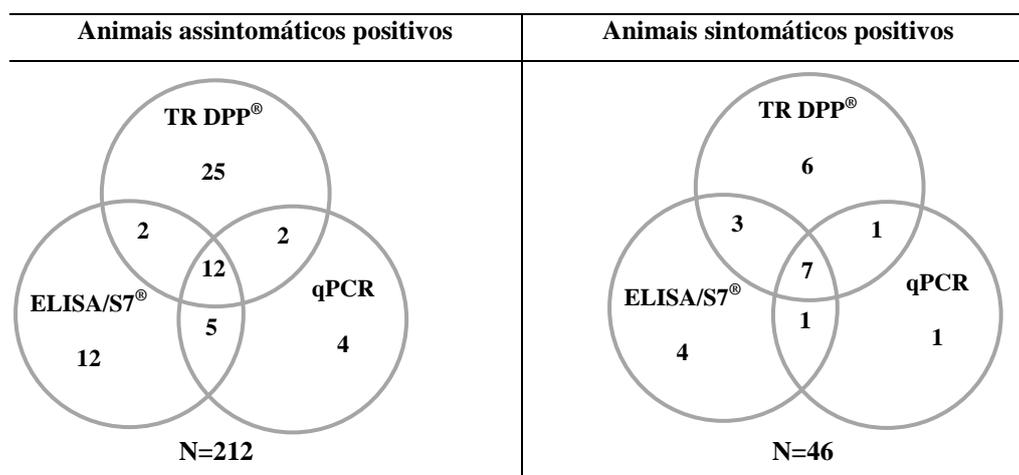
196

197 RESULTADOS E DISCUSSÃO

198

199 O TR DPP[®] com o antígeno k26/rk39/k9 e ELISA/S7[®] com HSP70 e um método
 200 molecular (qPCR) foram avaliados e os resultados mostraram valores positivos nos
 201 animais assintomáticos de 29,2% (62/212) e sintomáticos de 50,0% (23/46). A relação
 202 comparativa nos dois grupos quanto à positividade das amostras em pelo menos um dos
 203 testes encontra-se na Fig. 1.

204



205 **Figura 1.** Dados comparativos da relação dos resultados positivos entre o teste
 206 imunocromatográfico (TR DPP[®]), o sorológico (ELISA/S7[®]) e molecular (qPCR) nos grupos
 207 de animais assintomáticos e sintomáticos.

208

*N= Total de amostras

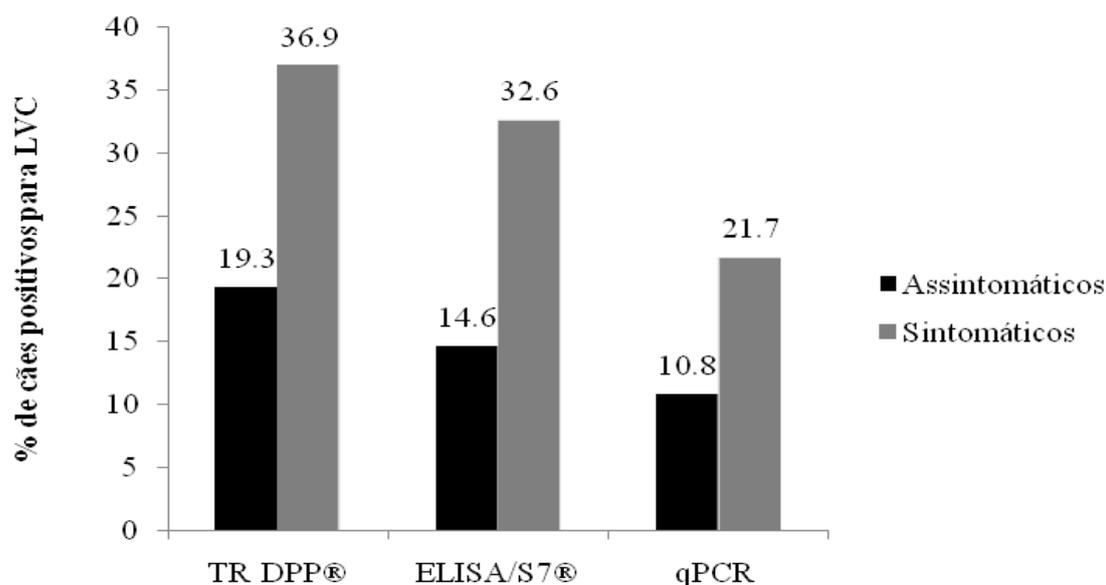
209

210 A relação entre os métodos de diagnósticos e o número de amostras positivas
 211 neste estudo demonstrou que o teste rápido TR DPP[®] apresentou maior número de
 212 animais positivos, tanto no grupo dos assintomáticos quanto nos sintomáticos. Nos
 213 animais assintomáticos, 2 amostras foram reagentes somente entre TR DPP[®] e
 214 ELISA/S7[®], 2 amostras somente entre o TR DPP[®] e qPCR, 5 amostras foram reagentes
 somente entre o ELISA/S7[®] e qPCR, no entanto 12 amostras foram reagentes nos três

215 testes. Na qPCR, 4 amostras tiveram resultado positivo exclusivo neste teste, sugerindo
216 que estes animais provavelmente estariam no início da infecção, devido a ausência dos
217 sinais clínicos e ausência de anticorpos. Outro ponto a ser avaliado é que 12 amostras
218 foram reagentes nos três testes mostrando resistência desses animais a infecção e
219 produção de diferentes tipos de anticorpos. O elevado número de amostras positivas no
220 teste imunocromatográfico e no teste sorológico demonstram uma possível falha da
221 técnica em detectar o DNA do antígeno em amostras de sangue, já que Maia e Campino
222 (2008) sugerem que a distribuição dos parasitas se apresenta de forma heterogênea em
223 cada tecido, devido ao tropismo da cepa por determinados tecidos. Os resultados
224 mostraram que 25 amostras reagiram exclusivamente no TR DPP[®] e 12 amostras
225 exclusivamente no ELISA/S7[®]. Os cães assintomáticos apresentam variação quanto às
226 respostas ao parasita, normalmente a expressão dos níveis de anticorpos são inferiores
227 quando comparados aos animais sintomáticos (Sollano-Gallego et al., 2001).

228 Entre os animais sintomáticos (Fig. 1) o estudo mostrou que 3 amostras reagiram
229 de maneira exclusiva entre o TR DPP[®] e ELISA/S7[®], 1 entre o TR DPP[®] e qPCR e 1
230 entre o ELISA/S7[®] e qPCR e 7 foram positivos nos três testes ao mesmo tempo. A
231 qPCR mostrou que apenas 1 amostra, das 10 positivas, não reagiu com nenhum dos
232 outros testes.

233 Na Fig. 2, podemos observar que a proporção entre amostras positivas foi maior
234 nos animais sintomáticos em relação aos assintomáticos. Esses resultados foram
235 semelhantes aos de Porrozzi et al. (2007), Grimaldi Jr et al. (2012), Silva et al. (2014)
236 quando avaliaram diferentes antígenos. Os diferentes tipos de antígenos podem variar
237 quanto à detecção de anticorpos em animais assintomáticos e sintomáticos. Os
238 anticorpos específicos anti-rK39 podem ser considerados como marcadores de
239 diagnóstico para a doença ativa nos cães. Os antígenos rK39 e rK26 apresentam elevada
240 sensibilidade nos animais sintomáticos para LVC, mostrando que o desempenho no
241 teste sorológico depende de muitos fatores, como o estado de infecção ou o antígeno
242 utilizado (Porrozzi et al., 2007).



243 **Figura 2.** Esquema representativo da relação entre as amostras de animais sintomáticos positivos
 244 nos testes diagnósticos da LVC.
 245

246 Nesse estudo, o TR DPP® apresentou resultados positivos superiores em relação
 247 ao ELISA/S7® e a qPCR, nos dois grupos. As diferenças de positividade que ocorreram
 248 entre o ELISA/S7® e TR DPP® provavelmente estão relacionadas à utilização de
 249 protocolos diferentes com antígenos específicos para cada teste. Certos antígenos
 250 podem induzir a produção de anticorpos muito mais cedo do que outros tipos, o que
 251 justificaria um maior número de animais positivos no TR DPP® em relação ao
 252 ELISA/S7® (Grimaldi Jr et al., 2012). Silva et al. (2014) tiveram resultados mais
 253 elevados com o ELISA, utilizando extrato solúvel de *Leishmania*, quando comparado
 254 com o TR DPP®, sugerindo que este teste rápido pode ser uma nova opção para ser
 255 utilizado como um método complementar em associação com o ELISA ou com outros
 256 métodos para diagnóstico da LVC.

257 Os resultados de sensibilidade, especificidade, do índice *kappa* e sua
 258 interpretação para amostras dos grupos de animais assintomáticos e sintomáticos
 259 relacionando os três testes, estão ilustradas nas Tab. 1 e 2, respectivamente. A
 260 sensibilidade e especificidade, tanto em animais assintomáticos quanto nos
 261 sintomáticos, do TR DPP® e do ELISA/S7® foram comparados com os resultados
 262 obtidos com a qPCR.

263

264

265 **Tabela 1.** Concordância estimada entre os resultados obtidos com a qPCR, TR DPP[®], ELISA/S7[®] e suas
 266 respectivas taxas de sensibilidade, especificidade e o índice *kappa* e sua interpretação para os 212 de
 267 animais assintomáticos avaliados no Semiárido Paraibano.

| ENSAIOS | qPCR | | Sensibilidade (%) | Especificidade (%) | <i>Kappa</i> (Interpretação) |
|-----------------------------|-----------------------|-----|----------------------|-----------------------|---------------------------------|
| | Pos | Neg | | | |
| TR DPP[®] | | | | | |
| Pos. | 14 | 27 | 61 | 86 | 0,35 (razoável) |
| Neg. | 09 | 162 | | | |
| ELISA/S7[®] | | | | | |
| Pos. | 17 | 14 | 74 | 93 | 0,58 (moderada) |
| Neg. | 06 | 175 | | | |
| ENSAIOS | ELISA/S7 [®] | | Sensibilidade (%) | Especificidade (%) | <i>Kappa</i> (Interpretação) |
| | Pos | Neg | | | |
| TR DPP[®] | | | | | |
| Pos. | 14 | 27 | 45 | 85 | 0,27 (razoável) |
| Neg. | 17 | 154 | | | |

268

269 Os resultados entre o TR DPP[®] e a qPCR, no grupo de animais assintomáticos,
 270 revelou que a concordância obtida através do coeficiente *kappa*, mostrou interpretação
 271 razoável (0,35) com valores de sensibilidade e especificidade de 61% e 86%,
 272 respectivamente. Porém, quando a concordância foi avaliada entre o ELISA/S7[®] e a
 273 qPCR os resultados foram melhores, mostrando um coeficiente *kappa* de 0,58
 274 interpretado como moderada concordância, com sensibilidade de 74% e especificidade
 275 de 93%. Essas diferenças observadas entre os resultados ocorreram em decorrência dos
 276 valores mais elevados entre os animais positivos nos testes recombinantes em relação
 277 aos obtidos na qPCR. Nossos resultados discordam dos valores obtidos por Assis et al.
 278 (2010) onde a PCR apresentou valores de positividade superiores ao de outros testes
 279 avaliando amostras de sangue e de outros tecidos, porém eles recomendam que a PCR
 280 quando utilizado para campanhas epidemiológicas, deve ser avaliado com cautela pelo
 281 fato de detectar apenas o DNA do parasita no sangue. Cavalcanti et al. (2009) utilizando
 282 as mesmas sequências iniciadoras específicas do presente estudo, avaliaram amostras de
 283 sangue e a sensibilidade atingiu 100% e 83,3% de especificidade.

284 Nos trabalhos de Grimaldi Jr et al. (2012) o TR DPP[®] e o ELISA apresentaram
 285 baixa expressão de sensibilidade quando os animais eram assintomáticos. Os mesmos
 286 resultados foram observados nesse estudo nos animais assintomáticos, a concordância
 287 entre os testes sorológicos demonstraram valores inferiores, com coeficiente *kappa* de
 288 0,27 sendo interpretado como razoável concordância entre os dois testes. O valor de

289 sensibilidade foi de 45% e especificidade de 85%. Embora, o TR DPP[®] e o ELISA/S7[®]
 290 obtiveram altos índices de positividade entre as amostras, a concordância regular entre
 291 os resultados possivelmente esteja relacionada ao fato que ambos os testes utilizam
 292 diferentes tipos de antígenos e, portanto, o parasita ao ser inoculado estimula o
 293 desenvolvimento de anticorpos específicos para diferentes tipos de antígenos.

294 Quanto aos animais sintomáticos, apresentados na Tab. 2, os resultados
 295 mostraram uma sensibilidade entre a qPCR e TR DPP[®] de 80% e especificidade de
 296 75% e índice *kappa* (0,44) com moderada concordância. Entre a qPCR e o ELISA/S7[®]
 297 os resultados foram de 80% e 81% de sensibilidade e especificidade, respectivamente e
 298 com *kappa* (0.51) representando uma concordância moderada. Lima et al. (2010)
 299 analisando o ELISA, utilizando a PCR como padrão-ouro, apresentaram diferentes
 300 resultados quanto a sensibilidade e especificidade, com valores de 100% e 91,2%,
 301 respectivamente.

302 **Tabela 2.** Concordância estimada entre os resultados obtidos com a qPCR, TR DPP[®] e ELISA/S7[®], taxas
 303 de sensibilidade, especificidade e o índice *kappa* e sua interpretação para os 46 animais sintomáticos
 304 avaliados no Semiárido Paraibano.

| ENSAIOS | qPCR | | Sensibilidade (%) | Especificidade (%) | <i>Kappa</i> (Interpretação) |
|-----------------------------|-----------------------|-----|----------------------|-----------------------|---------------------------------|
| | Pos | Neg | | | |
| TR DPP[®] | | | | | |
| Pos. | 08 | 09 | 80 | 75 | 0,44 (moderada) |
| Neg. | 02 | 27 | | | |
| ELISA/S7[®] | | | | | |
| Pos. | 08 | 07 | 80 | 81 | 0,51 (moderada) |
| Neg. | 02 | 24 | | | |
| ENSAIOS | ELISA/S7 [®] | | Sensibilidade (%) | Especificidade (%) | <i>Kappa</i> (Interpretação) |
| | Pos | Neg | | | |
| TR DPP[®] | | | | | |
| Pos. | 10 | 07 | 67 | 77 | 0,43 (moderada) |
| Neg. | 05 | 24 | | | |

305

306 A avaliação dos animais sintomáticos entre o TR DPP[®] e ELISA/S7[®] mostrou
 307 que o desempenho em relação aos assintomáticos foi melhor, com índice *kappa* (0,43) e
 308 moderada concordância. Estudos avaliando o TR DPP[®] mostraram que os resultados de
 309 sensibilidade (47-62%) e especificidade (87-96%) são variáveis, de acordo com os
 310 sinais clínicos (Grimaldi Jr et al., 2012., Santis et al., 2013).

311 Comparando os resultados dos testes entre os dois grupos de animais, os
 312 sintomáticos apresentaram melhores resultados de concordância entre os testes,

313 entretanto, o ELISA/S7[®] foi o teste que apresentou o melhor desempenho nos dois
314 grupos.

315

316 **CONCLUSÕES**

317 Com base nos resultados, o ELISA/S7[®] apresentou um melhor desempenho
318 entre os testes, embora o TR DPP[®] seja um teste de fácil execução e rápido diagnóstico.

319

320 **AGRADECIMENTOS**

321 CAPES. Biogene Indústria e Comércio LTDA. Secretárias de Vigilância Sanitária dos
322 municípios de Patos, São José de Espinharas, Santa Terezinha, Brejo do Cruz e
323 Aroeiras.

324

325 **REFERÊNCIAS**

326

327 ALMEIDA, M.A.O.; JESUS, E.E.V.; SOUSA-ATTA, M.L.B. et al. Clinical and
328 serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally
329 infected with *Leishmania chagasi*. Vet. Parasitol., v.127, p.227–232, 2005.

330

331 ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.;
332 JANNIN, J.; BOER, M. D. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its
333 Incidence. Plos one, v.7, p.1-12, 2012.

334

335 ASSIS, J.; QUEIROZ, N.M.G.P.; SILVEIRA, R.C. et al. Estudo Comparativo dos
336 métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP.
337 Rev. Bras. Parasitol. Vet., v.19, n.1, p.17-25, 2010.

338

339 BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Técnica: Esclarecimentos sobre o diagnóstico
340 sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde.
341 UVR/CGDT/DEVEP/SVS/MS, Brasília, p.1-5, 2011.

342

- 343 CASTRO-JÚNIOR, J.G.; FREIRE, M.L.; CAMPOS, S.P.S. et al. Evidence of
344 *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais
345 state, Brazil, based on immunochromatographic dual-path platform (DPP®) and PCR
346 assays. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.56, n.3, p.225-229, 2014.
- 347
- 348 CAVALCANTI ,M.P.;BRITO, M.E.F.;SOUZA,W.V. et al. The development of a real-
349 time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood.
350 Vet. J., v.182, p.356-358, 2009.
- 351
- 352 FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina:
353 grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. Rev. Pan-Amaz. Saude, v.3,
354 n.2, p.47-57, 2012.
- 355
- 356 GONTIJO, C.M.F; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual,
357 desafios e perspectivas. Rev. Bras. Epidemiol., v.7, n.3, p.338-349, 2004.
- 358
- 359 GRIMALDI JR, G.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L. et al. Evaluation of a novel
360 chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL
361 rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Trans. Am. Entomol.
362 Soc., v.106, p.54–59, 2012.
- 363
- 364 LIMA, V. M. F; FATTORI, K. R.; MICHELIN, A. F. et al. Comparison between
365 ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the
366 diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol., v.173, p.330–333, 2010.
- 367
- 368 MACKINNON A. Uma planilha para o cálculo das estatísticas abrangentes para a
369 avaliação de testes de diagnóstico e concordância entre avaliadores. Inf. Biol. Med.,
370 v.30, n.3, p.127-134, 2000.
- 371
- 372 MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune
373 response to infection. Vet. Parasitol., v.158, p.274–287, 2008.
- 374

- 375 MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; GRAVINO, A. E. Evidence for a relationship
376 between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res. Vet. Sci.*, v.87, p.76-78,
377 2009.
- 378
- 379 MISSAWA, N. A.; VELOSO, M.A.E.; MACIEL, G.B.M.L. et al. Evidência de
380 transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara,
381 Estado de Mato Grosso, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.44, n.1, p.76-78, 2011
- 382
- 383 PORROZZI, R.; DA COSTA, M.V.S.; TEVA, A. et al. Comparative Evaluation of
384 Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Based on Crude and Recombinant Leishmanial
385 Antigens for Serodiagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania infantum*
386 Visceral Infections in Dogs. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.14, n.5, p.544–548, 2007.
- 387
- 388 ROSÁRIO, E.Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J.C. et al. Evaluation of enzyme-
389 linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a
390 diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.100,
391 n.2, p.197-203, 2005.
- 392
- 393 SANTIS, B.; SANTOS, E.G.B.; SOUZA, C.S.F.; CHAVES, S.A.M. Performance of
394 DPP™ immunochromathographic rapid test (IRT) for canine visceral leishmaniasis:
395 comparison with other serological methods in suspected dogs from Cuiabá, Mato
396 Grosso State, Brazil. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.*, v.50, n.3, p.198-205, 2013.
- 397
- 398 SILVA, D.T.; STARKE-BUZETTI, W.A.; ALVES-MARTIN, M.F. et al. Comparative
399 evaluation of several methods for canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Rev. Bras.*
400 *Parasitol. Vet.*, v.23, n.2, p.179-186, 2014.
- 401
- 402 SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X. et al. *Leishmania infantum*-specific
403 IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas.
404 Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet. Parasitol.*, v.96, p.265-276,
405 2001.
- 406

- 407 THURSFIELD, M. Vet. Epidemiol., Wiley Blackwell, Oxford, 2007. 610p.
408
409 WERNECK, G.L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. Cad. Saúde
410 Pública, v.26, n.4, p.644-645, 2010.
411
412 WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee
413 on the Control of Leishmaniases, Geneva, 2010, 186 p.

6. CONCLUSÃO

Considerando que a eutanásia dos cães, como uma das formas de controle da LV, deve ser realizada com base em um método diagnóstico altamente confiável e que apesar das inúmeras pesquisas e avanços a respeito do diagnóstico da doença, os resultados desse estudo revelaram que nenhum teste diagnóstico foi capaz de detectar todos os animais positivos pelo mesmo teste mostrando que para diagnóstico dessa doença é necessária à associação de diferentes métodos, sendo que o ELISA/S7[®] apresentou o melhor desempenho e a TR DPP[®] mostrou ser um teste de rápido resultado, fácil execução sugerindo que o diagnóstico poderá ser feito usando o TR DPP[®] como teste de triagem e o ELISA/S7[®] como teste confirmatório, embora seja necessário aprimoramento no desenvolvimento dos antígenos.

7. ANEXOS

NORMAS DA REVISTA

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

(Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

Política Editorial

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação on-line do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.
- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.
- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.
- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- O ABMVZ comunicará, via eletrônica, a cada autor, a sua participação no artigo. Caso pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

- **Artigo científico**

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

- **Relato de caso**

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

▪ **Comunicação**

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o Webster’s Third New International Dictionary. Para ortografia em português adota-se o Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

- O texto NÃO deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

- **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.
- **Autores e Filiação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.
2. o texto do artigo em pdf **NÃO** deve conter o nome dos autores e filiação.

- **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.
- **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco.
- **Introdução.** Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.
- **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.
- **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.
 - ✓ **Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

- ✓ **Figura.** Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Nota:

- ✓ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.
- **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).
- **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.
- **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.
- **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

- A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:
 - ✓ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
 - ✓ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
 - ✓ mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)

- ✓ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.
- *Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.
- *Comunicação pessoal.* Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. Am. J. Vet. Res., v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. Not. Med. Vet., n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. Anais... São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critical6.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

- Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.
- O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência e/ou “Aguardando liberação do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação:

- **Taxa de submissão.** A taxa de submissão de R\$50,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.
- **Taxa de publicação.** A taxa de publicação de R\$95,00, por página impressa em preto e R\$280,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências:

- No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.

NORMAS DA DISSERTAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Capa – Branca para mestrado e verde para doutorado;

Lado – ano, nome do aluno (primeiro e último por extenso);

Frente – universidade, centro, programa, título, nome do aluno, orientadores;

Margem – 2cm no trabalho todo;

Folha de rosto – cópia da Capa;

Folha de aprovação

Resumo – no máximo 1 página, espaço simples e fonte Times 12;

Abstract – idem (Tradução do resumo);

Lista de Figuras da revisão bibliográfica;

Lista de Figura de cada artigo com página;

Lista de Tabelas da revisão bibliográfica;

Lista de Tabelas de cada artigo com página;

Lista de abreviações;

Sumário;

Formatação: Times 12, espaçamento 1,5;

Introdução (deve constar a delimitação do assunto tratado, os objetivos e a justificativa da pesquisa);

Revisão Bibliográfica (capítulo I – a critério do autor, a revisão pode ser subdividida);

Referências da revisão Bibliográfica (devem seguir as normas da ABNT)

Artigos publicados ou que serão submetidos (demais capítulos – cada artigo deve ser antecedido por uma página contendo o título, nome do periódico onde será publicado ou para o qual será submetido

a publicação – o manuscrito deve ser editado de modo que as figuras e tabelas, bem como suas respectivas legendas, estejam situadas dentro do texto);

Conclusão;

Anexos Obrigatórios: Normas das revistas e a comprovação da submissão do aceite (caso já tenha sido submetido ou publicado);

Anexos Opcionais: Detalhes da metodologia; Resultados complementares que não foram apresentados nos artigos; Figuras e tabelas não apresentadas no manuscrito; resumos de congressos.