

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Ana Izabel Passarella Teixeira

**Cães e tutores: os desafios do diagnóstico e do
controle da leishmaniose visceral canina**

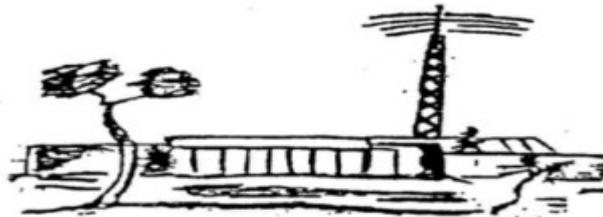
Brasília
2019

**Cães e tutores: os desafios do diagnóstico e do controle da
leishmaniose visceral canina**

Ana Izabel Passarella Teixeira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical, na área de concentração: Biologia das doenças infecciosas de parasitárias

Orientador: Professor Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero



Brasília

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pc Passarella Teixeira, Ana Izabel
Cães e tutores: os desafios do diagnóstico e do controle da leishmaniose visceral canina / Ana Izabel Passarella Teixeira; orientador Gustavo Adolfo Sierra Romero. -- Brasília, 2019.
178 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Medicina Tropical) -- Universidade de Brasília, 2019.

1. leishmaniose visceral canina. 2. testes diagnósticos. 3. sorologia. 4. fatores de risco. 5. acurácia. I. Sierra Romero, Gustavo Adolfo, orient. II. Título.

Data da Defesa

18 de março de 2019

Banca Examinadora

Professor Doutor Gustavo Adolto Sierra Romero (Presidente)

Universidade de Brasília

Doutora Rafaella Albuquerque e Silva (Membro)

Ministério da Saúde

Doutor Rafael Rocha de Andrade (Membro)

Universidade de Brasília

Doutor Henry Maia Peixoto (Membro)

Universidade de Brasília

Doutor Wildo Navegantes de Araújo (Suplente)

Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

É difícil registrar adequadamente em um papel a gratidão que sinto a todos os que fizeram parte deste processo.

Sou imensamente grata ao meu marido Bernardo, minha mãe Izabel, meus sogros meus familiares e amigos que me ajudaram a lidar com o difícil nascimento e o longo período de internação na UTI neonatal da minha querida Mariana, e com o terminar esse trabalho. Sem eles, eu não teria conseguido “sobreviver” a tudo.

Ao professor Gustavo, acho que nem sei bem o que dizer. Apesar de tudo, ele me apoiou e me deu tranquilidade para conseguir terminar. Não foi só um orientador acadêmico, foi um “orientador de vida”, que com seu comportamento e exemplo, frente a situações boas bem como nas adversas, muito me fez refletir e aprender muito. O professor Gustavo e a professora Regina, sua esposa, estiveram no meu casamento, bem como fizeram questão de ir à UTI Neonatal para me confortar e esclarecer, quando eu não conseguia compreender o que se passava com a minha filha – ela estava se recuperando de uma infecção hospitalar que havia evoluído com sepse. Amigos sempre presentes nas horas boas e ruins. Portanto, a minha gratidão a ele e à professora Regina não cabe mesmo num papel.

À Debora, “alma-gêmea-acadêmica”, que conheci por acaso, mas desde o primeiro momento nos demos muito bem. Ela acreditou no trabalho, e, sem ela, digo com certeza, ele não teria chegado a bom termo.

Agradeço também a todos os que acreditaram em mim e no projeto, integrando a equipe de coleta e me doando alguns dos seus sábados e domingos.

Aos professores do Programa, com quem muito aprendi e amadureci: pessoas a quem realmente passei a admirar.

Ao pessoal do NMT: às “Anas do Lableish”, que, com seu trabalho exemplar, amizade e companheirismo, sempre ajudaram a conseguir executar as análises, e com quem aprendi muito sobre como trabalhar em equipe em um laboratório; à Lúcia e Adriana, sempre com uma palavra amável ao perguntar sobre a saúde da Mariana, bem como Maria, Joana e Valdemiro, também sempre preocupados com a minha menina.

Com certeza, esses agradecimentos não refletem o tamanho e a dimensão da minha gratidão. Estes anos foram um período muito difícil para mim – por razões de ordem *marianesca*. No entanto, todas as pessoas que passaram na minha vida durante esse doutoramento me fizeram amadurecer, aprender e conseguir deixar que tudo ficasse melhor.

A vocês, minha gratidão, meu amor, em especial pela certeza que ajudaram a construir em mim de que eu sei que estou no caminho correto.

INDÍCE DE TABELAS

Tese: Cães e tutores: os desafios da leishmaniose visceral canina no Distrito Federal

Tabela 1 - Solução de Master Mix para PCR de kDNA	50
Tabela 2 - Solução de Master Mix para PCR de ITS1	51

Artigo 1: A definição de um padrão de referência mais adequado para as necessidades de diagnóstico da leishmaniose visceral canina: um desafio para os testes atuais e futuros

Tabela I – Acurácia dos testes sorológicos para diagnóstico de leishmaniose visceral canina, Brasília, Distrito Federal, 2017.....	72
Tabela SI. – Concordância bruta entre os resultados dos testes que compuseram o padrão de referência.....	85
Tabela SII – Concordância bruta entre os testes sorológicos avaliados.....	86
Tabela SIII – Acurácia dos testes sorológicos em testagem sequencial para diagnóstico de leishmaniose visceral canina, Brasília, Distrito Federal, 2017.....	86

Artigo 2: O risco da leishmaniose visceral canina no Brasil: um estudo transversal avaliando características dos proprietários dos animais enquanto preditores de infecção

Tabela I – Frequências absolutas e relativas de cada sinal clínico observado nos cães infectados e não infectados. Brasília 2015-2017.....	100
Tabela II – Frequência absoluta de resultados positivos concordantes entre os exames de diagnóstico realizados em cães residentes na região administrativa da Fercal, Distrito Federal 2015-2017.....	104
Tabela III – Análise bivariada dos fatores biológicos associados a leishmaniose visceral canina, Brasília 2015-2017.....	106
Tabela IV – Análise bivariada dos fatores relacionados ao ambiente em que o animal reside associados a leishmaniose visceral canina, Brasília 2015-2017.....	107
Tabela V – Análise bivariada dos fatores relacionados aos cuidados com os animais pelos seus proprietários associados a leishmaniose visceral canina, Brasília 2015-2017.....	108
Tabela VI – Análise de regressão hierárquica de Poisson com fatores de cuidados como categoria de exposição proximal e biológicos como categoria de exposição distal.....	109

Tabela SI – Análise da distribuição do risco entre os quartis para a definição do ponto de corte.....	120
---	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Tese: Cães e tutores: os desafios da leishmaniose visceral canina no Distrito Federal

Figura 1 – Série Temporal com os números de casos confirmados e coeficientes de incidência (1:100.000) da Leishmaniose Visceral no Brasil dos anos de 2001 a 2017 (Fonte: Sinan/SVS/MS 2018)	17
Figura 2 – Fluxograma de aplicação dos critérios de elegibilidade.....	39
Figura 3 – Representação esquemática do sistema de seleção de residências.....	40
Figura 4 – Fluxograma de coleta de dados e de amostras biológicas.....	41
Figura 5 – Fluxograma de coleta de amostras e exames realizados em cada animal.....	43
Figura 6 – Representação esquemática da aplicação de soro nas placas para realização do ELISA rk39, Belo Horizonte, 2017.....	48

Artigo 1: A definição de um padrão de referência mais adequado para as necessidades de diagnóstico da leishmaniose visceral canina: um desafio para os testes atuais e futuros

Figura I - Fluxograma de seleção de amostras, Brasília, DF, 2017.....	69
Figura II - Distribuição do escore clínico de LVC nos grupos de animais infectados e não infectados Brasília 2017. 55 cães não infectados, mediana 1 (IQR:0-3; intervalo 0-12 pontos). 66 cães infectados, mediana 1; (IQR:0-3; intervalo 0-26 pontos). (Mann-Whitney U test; p=0,708).....	71
Figura SI. Valores preditivos positivos e negativos dos testes sorológicos avaliados para prevalências hipotéticas de infecção canina variando de 0 a 70%.....	88

Artigo 2: O risco da leishmaniose visceral canina no Brasil: um estudo transversal avaliando características dos proprietários dos animais enquanto preditores de infecção

Figura I – Localização geográfica da região administrativa da Fercal no Distrito Federal, Brasil.....	93
Figura II – Representação de como foi realizada a coleta sistemática.....	95
Figura III - Distribuição do escore clínico de LVC nos grupos de animais infectados e não infectados, Brasília 2017. 118 cães não infectados, mediana 1 (IQR:0-3; intervalo 0-14 pontos). 42 cães infectados, mediana	

2; (IQR:0-3; intervalo 0-26 pontos). (Mann-Whitney U test; p=0,377).....105

Comunicação curta: Análise espacial dos casos prevalentes de leishmaniose visceral canina utilizando diferentes parâmetros para a definição de caso de infecção

Figura I – Localização da Região Administrativa da Fercal, Distrito Federal, Brasil.....126

Figura II – Mapas de Kernel com os hot-spots de acordo com os dois critérios de detecção de cães com LVC. Distrito Federal, Brasil.....127

INDICE DE QUADROS

Tese: Cães e tutores: os desafios da leishmaniose visceral canina no Distrito Federal

Quadro 1 – Sinais clínicos da LVC de acordo com o local afetado.22

Quadro 2 – Técnicas diagnósticas utilizadas (comercialmente ou em laboratórios de pesquisa) para o diagnóstico da LVC.....24

Quadro 3 - Relação entre a classe econômica e a renda média bruta familiar.....42

Quadro 4 - Grau de parasitismo em relação ao número médio de amastigotas identificados por campo.....45

Artigo 1: A definição de um padrão de referência mais adequado para as necessidades de diagnóstico da leishmaniose visceral canina: um desafio para os testes atuais e futuros

Quadro I - Escore de sinais clínicos sugestivos de LVC, conforme adaptação do modelo de Proverbio e colaboradores (2014)62

Artigo 2: O risco da leishmaniose visceral canina no Brasil: um estudo transversal avaliando características dos proprietários dos animais enquanto preditores de infecção

Quadro I - Relação entre a classe econômica e a renda média bruta familiar.....96

Lista de Siglas e Abreviaturas

18s DNA	Segmento do DNA ribossomal
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> (Síndrome da imunodeficiência adquirida)
APA	Área de proteção ambiental
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
CODEPLAN	Companhia de Planejamento do Distrito Federal
CPqRR	Centro de Pesquisas Rene Rachou
CytB	Citocromo B
DAT	teste de aglutinação direta (<i>Direct Agglutination test</i>)
DIVAL-DF	Diretoria de Vigilância Ambiental do DF
DIVEP-DF	Diretoria de Vigilância Epidemiológica do DF
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EIE-LVC	Ensaio imunoenzimático para diagnóstico de LVC
ELISA	<i>Enzyme linked Immusorbente Assay</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Hsp70	<i>70 kilodaltons heat shock proteins</i>
HR	<i>Hazard Ratio</i>
IFI	Imunofluorescência indireta
ITS1	Gene <i>Internal transcribed Spacer 1</i>
kDNA	DNA do cinetoplasto
LAMP	<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>
LVC	leishmaniose visceral canina
LVH	leishmaniose visceral humana
MS	Ministério da Saúde

mpb	Marcador de pares de base
NMT	Núcleo de Medicina Tropical
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/ World Health Organization
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	Reação em cadeia da Polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
pb	Pares de base
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RA	Região Administrativa
RP	Razão de prevalência
rpm	Rotações por minuto
SES-DF	Secretaria de Saúde do DF
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SSU rRNA	<i>Small subunit ribossomal ribonucleic acid</i>
Th1	"T <i>helper 1</i> " (linfócito auxiliar tipo 1)
Th2	"T <i>helper 2</i> " (linfócito auxiliar tipo 2)
TMB	tetrametilbenzina
UnB	Universidade de Brasília
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

Financiamento

Edital FAP/DF: 03/2015 Processo 193.000.867/2015

Edital FAPDF 06/2013; Processo nº. 193.000.233/2014.

CNPq: 142247/2015-4

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral humana (LVH) e da leishmaniose visceral canina (LVC)	15
1.2 Leishmaniose visceral canina (LVC): sinais clínicos e imunopatologia	20
1.3 Diagnóstico da LVC.....	23
1.4 Fatores associados à ocorrência da LVC	27
1.5 Epidemiologia, controle e prevenção da LVC	30
2. JUSTIFICATIVA.....	34
3. OBJETIVOS.....	36
4. MÉTODOS.....	37
4.1 Estudo de prevalência e dos fatores associados a LVC	37
4.2. Estudo de acurácia e confiabilidade do teste DAT-Canis	53
5. RESULTADOS	57
5.1 Artigo 1: Aprimoramento do padrão de referência para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina: um desafio para atuais e futuros testes diagnósticos.	57
5.2 Artigo 2: O risco da leishmaniose visceral canina no Brasil: um estudo transversal avaliando características dos proprietários dos animais enquanto preditores de infecção	89
5.3 Comunicação curta: Análise espacial dos casos prevalentes de leishmaniose visceral canina utilizando diferentes parâmetros para a definição de caso de infecção.....	122
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	129
7. CONCLUSÕES.....	133
REFERÊNCIAS	134
Apêndice I: Ficha de avaliação clínica	151
Apêndice II: Orientações para o preenchimento da ficha de avaliação clínica	152
Apêndice III: Bloco I – variáveis relacionadas ao status socioeconômico.....	153
Apêndice IV: Blocos II e III variáveis relacionadas as características do ambiente residencial e as de cuidados ofertados aos cães	154
Apêndice V: Orientações sobre O Preenchimento Do Questionário.....	155
Apêndice VI – Tabelas de Covariância	157
Apêndice VII – Artigo publicado	161
Anexo I: Localização Fercal e APA Cafuringa.....	177
Anexo II: Certificado CEUA.....	178

RESUMO

TEIXEIRA, Ana Izabel P. Cães e tutores: os desafios do diagnóstico e do controle da leishmaniose visceral canina. Tese (Doutorado em Medicina Tropical, Área de Concentração em Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília 2019

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma enfermidade que, apesar dos esforços de controle, continua a ser um problema de saúde pública, sendo um dos pontos mais cruciais a identificação acurada dos cães infectados. Nesse sentido, os estudos de validação dos testes diagnósticos utilizados na LVC são de suma importância, porém os estudos disponíveis frequentemente apresentam resultados heterogêneos na acurácia dos testes. Essa heterogeneidade decorre em parte da diversidade de padrões de referência utilizados e do tempo de evolução da infecção nos animais, dentre outros fatores. Outro tipo de estudo que pode ajudar a compreender a leishmaniose visceral canina é o estudo dos fatores associados à sua ocorrência. A tese foi desenvolvida em dois componentes, o primeiro, dedicado a estudar a acurácia de testes diagnósticos e, o segundo, para explorar os fatores associados à infecção. Os objetivos foram: i) avaliar a acurácia dos testes TR-DPP (Biomanguinhos®), EIE-LVC (Biomanguinhos®), o ELISA rk39 (*in house*) e o teste DAT-Canis frente a um padrão de referência constituído por uma combinação de técnicas parasitológicas e técnicas moleculares; ii) estimar a prevalência de infecção e doença em uma população canina em uma área endêmica do Distrito Federal e; iii) estudar os fatores associados à infecção canina. O primeiro componente foi o estudo de validação de testes diagnósticos de fase II/III em uma amostra de soros de 123 cães, predominantemente assintomáticos, residentes em uma área endêmica de leishmaniose visceral, previamente armazenados em um biobanco. Dos 123 animais, 69 (56,1%) foram considerados infectados de acordo com o padrão de referência estabelecido. A sensibilidade e a especificidade de cada teste foram, respectivamente: DAT-Canis [18,84% (IC95% 11,35% a 29,61%) e 96,30% (IC95% 87,46% a 98,98%)]; EIE-LVC [11,59% (IC95% 5,99% a 21,25%) e 90,74% (IC95% 80,09% a 95,98%)]; TR-DPP [21,74% (IC95% 13,64% a 32,82%) e 92,59% (IC95% 82,45% a 97,08%)] e ELISA rK 39 [37,68% (IC95% 27,18% a 49,48%) e 83,33% (IC95% 71,26% a 90,98%)]. Todos os testes apresentaram valores de sensibilidade baixos e especificidade elevada. Este comportamento poderia ser atribuído pelo menos em parte à elevada sensibilidade do padrão de referência combinado. Consequentemente foi possível identificar um maior número de cães assintomáticos e sugere que a falta de especificidade imputada tradicionalmente ao diagnóstico sorológico deve-se em parte à imperfeição do padrão de referência utilizado em outros estudos de validação. Em relação a esse componente, conclui-se que a

baixa sensibilidade dos testes sorológicos para o diagnóstico de cães assintomáticos deve constituir preocupação prioritária no processo de desenvolvimento de novos testes diagnósticos a serem utilizados no programa de controle de leishmaniose visceral no Brasil. O segundo componente foi um estudo transversal que estimou a prevalência da infecção e da doença, e que, por meio de uma análise regressiva de Poisson avaliou os fatores associados à infecção canina. Os fatores de exposição foram analisados estabelecendo hierarquias entre eles seguindo um processo de construção do modelo que pudesse explicar racionalmente a causalidade potencial em relação ao desfecho, utilizando a regressão de Poisson. A prevalência da infecção foi 26,25% (IC95%: 20,05 a 33,57) e 13,75% (IC95%: 9,26 a 19,94) dos cães apresentaram infecção sintomática. A prevalência de cães soropositivos, de acordo com a metodologia recomendada pelo Ministério da Saúde foi 9,38% (IC95% 5,76-14,89). Os fatores de exposição que apresentaram associação com a infecção foram: pelagem curta [Razão de Prevalência (RP): 2,331 (IC95% 1,023 a 5,216)]; presença de quintal com predominância de terras e/vegetação [RP: 4,153 (IC95% 1,351 a 12,766)]; e o maior escore de poder aquisitivo [RP: 2,027 (IC95% 1,156 a 3,544)]. Os resultados da análise da distribuição espacial dos cães infectados, com dois critérios diagnósticos distintos - o critério do programa de controle baseado em testes sorológicos versus o critério mais sensível do padrão de referência utilizado no estudo de prevalência - revelou diferenças na abrangência das áreas de interesse para aplicação das intervenções de controle de LVC. Em conclusão, este é o primeiro estudo que relaciona uma melhor condição socioeconômica de proprietários de cães com maior prevalência de infecção por leishmaniose visceral. A associação com a condição socioeconômica deverá ser explorada em profundidade para identificar se fatores, tais como, melhor alimentação, vacinação contra doenças letais e outros cuidados oferecidos aos animais de proprietários de maior renda estariam influenciando na taxa de sobrevivência desses animais o que permitiria que fossem expostos por ao risco de infecção e permanecessem assintomáticos mais tempo. Os hábitos de recusa à realização e eutanásia dos animais também podem estar associados à maior prevalência de infecção nesse grupo e precisam ser documentados em estudos futuros. Finalmente, a combinação de exames sorológicos atualmente recomendados para a detecção da infecção canina demonstrou-se pouco sensível o que poderia afetar a tomada de decisão sobre a priorização de áreas para a aplicação de medidas de controle - conforme demonstrado pela comparação dos mapas gerados na análise espacial - e aponta para a urgente necessidade de revisão dessa abordagem em termos de saúde pública.

Palavras chave: leishmaniose visceral canina, testes diagnósticos, sorologia, fatores de risco, soroprevalência, acurácia.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Ana Izabel P. Dogs and owners: the challenges of diagnosis and control of canine visceral leishmaniasis. Thesis (Doctoral Degree in Tropical Medicine, Concentration Area in Biology of Infectious and Parasitic Diseases) – Postgraduation Program in Tropical Medicine. University of Brasília, Brasília, 2019.

Despite control efforts, canine visceral leishmaniasis continues to be a public health problem, and accurate identification of infected dogs remains a crucial issue. In this sense, diagnostic tests validation studies used to identify infected dogs are of paramount importance, even though available studies of such kind often present heterogeneous accuracy results. This heterogeneity stems in part from the diversity of reference standards used and the time of infection evolution in the animals, among other factors. Another type of study that may help to understand canine visceral leishmaniasis is the study of the factors associated with its occurrence. This thesis was developed in two stages, the first was dedicated to studying diagnostic tests accuracy and the second was concerned with exploring factors associated with infection development. The objectives were: i) to evaluate the accuracy of the TR-DPP (Biomanguinhos®), EIE-LVC (Biomanguinhos®), ELISA rk39 (in house) tests and the DAT-Canis test against a reference standard consisting of a combination of parasitological techniques and molecular techniques; ii) to estimate the prevalence of infection and disease in a canine population in an endemic area of the Federal District; iii) to study the factors associated with canine infection. The first stage was a phase II / III diagnostic validation study in biological samples of 123 dogs, predominantly asymptomatic, living in an endemic area of visceral leishmaniasis, previously stored in a biobank. Of the 123 animals, 69 (56.1%) were considered infected according to the established reference standard. The sensitivity and specificity of each test were respectively: DAT-Canis [18.84% (95% CI: 11.35% to 29.61%) and 96.30% (95% CI: 87.46% to 98.98%)]; EIE-LVC [11.59% (95% CI: 5.99% to 21.25%) and 90.74% (95% CI: 80.09% to 95.98%)]; TR-DPP [21.74% (95% CI: 13.64% to 32.82%) and 92.59% (95% CI: 82.45% to 97.08%)] and rK 39 ELISA [37.68% (95% CI: 27.18% to 49.48%) and 83.33% (95% CI: 71.26% to 90.98%)]. All tests had low sensitivity and high specificity. This behavior could be attributed at least in part to a high sensitivity of the combined reference standard. Therefore, it was able to identify a greater number of asymptomatic dogs as well as suggest that the lack of specificity traditionally imputed to the serological diagnosis because of the imperfection of the reference standard used in other validation studies. Regarding this results, low sensitivity of serological tests for the diagnosis of asymptomatic dogs was considered to be a priority concern for developing new diagnostic tests in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. The second study was a cross-sectional study which estimated the prevalence of infection and disease, and that evaluated factors associated with canine infection through

Poisson regression analysis. Exposure factors were analyzed by establishing hierarchies among them following a process of model construction that could rationally explain potential causality in relation to the outcome. The prevalence of infection was 26.25% (95% CI: 20.05 to 33.57) and 13.75% (95% CI: 9.26 to 19.94) of the dogs presented symptomatic infection. The prevalence of seropositive dogs, according to the methodology recommended by the Ministry of Health was 9.38% (95% CI, 5.76 to 14.89). The exposure factors associated with the infection were: short coat [Prevalence Ratio (PR): 2,331 (95% CI 1.023 to 5.216)]; presence of a backyard with predominance of land and vegetation [RP: 4,153 (95% CI 1,351 to 12,766)]; and the dichotomous purchasing power score [RP: 2.027 (95% CI 1.156 to 3.544)]. The results of the analysis of the spatial distribution of infected dogs with two distinct diagnostic criteria - the criterion of the control program based on serological tests versus the most sensitive criterion of the reference standard used in the prevalence study - revealed differences in the range of areas of interest for the application of LVC control interventions. This research is the first one to relate higher socioeconomic condition of dog owners with a higher prevalence of visceral leishmaniasis infection. This finding should be explored in depth to identify whether factors such as improved feeding, vaccination against lethal diseases and other care offered to the animals of higher income owners would be influencing the survival rate of these animals by allowing them to be exposed to the risk of infection and remain asymptomatic for longer. Habits of refusal to perform euthanasia of animals may also be associated with the higher prevalence of infection in this group and need to be documented in future studies. Finally, the combination of serological tests currently recommended for the detection of canine infection was not very sensitive, which could affect decision making on the prioritization of areas for the application of control measures - as demonstrated by the comparison of the maps generated in the analysis spatial - and points to the urgent need to revise this approach in terms of public health.

Keywords: canine visceral leishmaniasis, diagnostic tests, serology, risk factors, seroprevalence, accuracy.

1.INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral humana (LVH) e da leishmaniose visceral canina (LVC)

As leishmanioses são um complexo de enfermidades presentes em mais de 98 países espalhados por todos os continentes e que é responsável por cerca de 2 milhões de novos casos por ano. Reporta-se que aproximadamente 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contraírem essas doenças, a maioria delas de países em desenvolvimento (Alvar et al., 2012; WHO, 2010).

Esse complexo de enfermidades zoonóticas abrange diversas apresentações clínicas, como a leishmaniose cutânea, a leishmaniose mucosa e a leishmaniose visceral (LV). São causadas por protozoários que possuem flagelo único (promastigota) e uma estrutura denominada cinetoplasto e que são pertencentes ao gênero *Leishmania*, classe Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (Akhoundi et al., 2016).

O gênero *Leishmania* é subdividido em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. Essa diferenciação é baseada no local onde ocorre o desenvolvimento do parasito no mosquito vetor: os protozoários subgrupo *Leishmania* se desenvolvem no intestino médio do vetor e os do subgrupo *Viannia* começam a infecção no triângulo pilórico e depois passam para o terço final do intestino. Pertencente ao primeiro subgrupo, *Leishmania infantum* é conhecida como a causadora da leishmaniose visceral nas Américas e na bacia do Mediterrâneo, enquanto *Leishmania donovani* é responsável pela doença na Ásia e na África (Lainson 2010).

Os hospedeiros invertebrados intermediários, ou vetores da leishmaniose, são flebotomíneos da família *Psychodidae*, sendo que os gêneros mais importantes na transmissão das leishmanioses são: *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, nas Américas, onde o principal vetor de *L. infantum* é *Lu. longipalps* (Brasil, 2014).

Dentre os tipos de leishmanioses, a visceral é tida como a apresentação mais grave, e como em todas as espécies de leishmanias, cujo ciclo biológico é composto de duas fases, um no vetor e um no hospedeiro mamífero (Lipoldová & Demant 2006; Herricks et al. 2017).

O estágio no vetor começa após o repasto sanguíneo no hospedeiro, quando ocorre a ingestão de macrófagos infectados por amastigotas ou amastigotas livres do parasito. As amastigotas se transformam em promastigotas no terço médio do intestino do flebotomíneo, e finalmente em promastigotas metacíclicos na região anterior que constituem a forma infectante (Lipoldová & Demant, 2006) e provocam uma espécie de bloqueio no intestino do vetor, que o faz regurgitar no momento do repasto sanguíneo, o que favorece a inoculação das formas infecciosas em um novo hospedeiro mamífero (Schlein et al., 1992).

No mamífero, a infecção começa com a inoculação de formas promastigotas metacíclicas, por meio da picada durante o repasto sanguíneo. Em sequência, tem-se uma reação inflamatória que recruta células do sistema mononuclear fagocitário (Séguin & Descoteaux 2016).

No interior desses grupos celulares, as promastigotas que foram englobadas precisam tornar o ambiente intracelular favorável para o seu desenvolvimento. Assim interrompem o processo de fusão do vacúolo com endossomos e lisossomos, formando assim o vacúolo parasitóforo, onde se multiplicam e se transformam em amastigotas (Liévin-Le Moal & Loiseau, 2016; Almeida et al. 2017).

Quando termina esse ciclo de desenvolvimento, começa a etapa de transmissão para outra célula do sistema mononuclear fagocitário. Os amastigotas elaboram sua saída por meio da expressão de substâncias zeióticas semelhantes às que induzem apoptose e, assim, vacúolos contendo amastigotas viáveis são resgatados por células vicinais para realizarem um novo ciclo de desenvolvimento (Liévin-Le Moal & Loiseau, 2016).

A leishmaniose visceral humana LVH atinge principalmente crianças, idosos e pessoas com alguma imunodeficiência, como AIDS e doenças

autoimunes, bem como transplantados. É notável que, em algumas regiões brasileiras endêmicas, a maior parte acometida é composta por adultos jovens do gênero masculino (Brasil, 2014).

Em geral, a maior parte dos atingidos vive em condições de extrema pobreza, ou em áreas onde ocorrem conflitos armados (Berry & Berrang-Ford, 2016). Em 2010 a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou que a LVH era uma doença em expansão e que não há ferramentas adequadas para seu controle, sendo hoje uma enfermidade classificada como uma doença negligenciada (WHO, 2010).

No Brasil, a doença teve distribuição predominantemente rural, silvestre, com poucos casos acontecendo em áreas urbanas. Porém, nas últimas décadas tem passado por um processo de adaptação dos seus meios de transmissão (Abrantes et al. 2018) tendo adquirido caráter epidêmico em grandes cidades como Teresina, São Luiz, Belo Horizonte, Campo Grande e Fortaleza.

A LVH ocorre no Brasil com um padrão endêmico conforme a figura 1 apresenta:

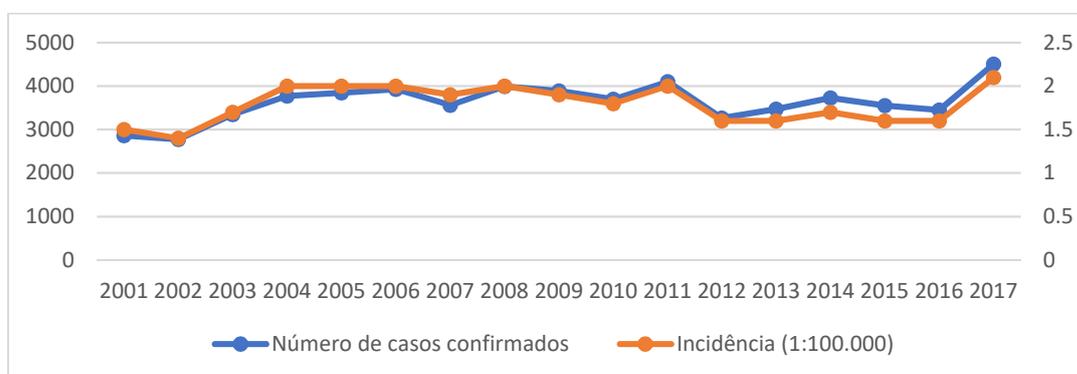


Figura 1 - Série Temporal com os números de casos confirmados e coeficientes de incidência (1:100.000) da Leishmaniose Visceral no Brasil dos anos de 2001 a 2017 (Fonte: Sinan/SVS/MS 2018)

E o desenvolvimento dessa morbidade no Brasil tem apresentado diferentes tendências de expansão e retração em diversos municípios. Sendo que, apesar de ter uma incidência relativamente controlada, encontra-se atualmente mais disseminada do ponto de vista territorial, afetando localidades que anteriormente não eram acometidas. Diversos autores

afirmam que a doença sofre dispersão espacial considerável, com relato de casos novos em áreas anteriormente indenes e adaptabilidade e expansão em áreas urbana (Maia-Elkhoury et al. 2008; Brasil. 2014; Abrantes et al. 2016; Campos et al. 2017b; Bezerra et al. 2018; Silva et al. 2018a).

Nesse contexto, o controle da LVH atualmente preconizado pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2014) é baseado em quatro pilares: 1) diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos; 2) combate ao vetor – o flebótomo do gênero *Lutzomyia*; 3) detecção de cães portadores, por meio de uma combinação de testes sorológicos, e sua eliminação por meio da eutanásia, por serem considerados reservatórios; 4) educação em saúde e conscientização da população para essa enfermidade.

O diagnóstico é baseado na detecção do parasito e/ou exames sorológicos (Brasil, 2011; Brasil, 2014) que são realizados em unidades de referência. Atualmente foi implantado um teste sorológico imunocromatográfico rápido nas unidades de referência para agilizar o diagnóstico (Brasil, 2011), porém o impacto dessa medida ainda deve ser determinado em novos estudos (Menon et al., 2016).

O controle do vetor é, de fato, importante para se combater as leishmanioses. Porém, é um cenário extremamente desafiador, pois novas pesquisas têm demonstrado que outras espécies de flebotomos tem potencial participação como vetores da infecção, como, por exemplo o *Lu. migonei* (Quinnell & Courtenay, 2009; Mello et al. 2014; Menon et al. 2016) e o *Lutzomyia fischeri* que recentemente foi identificado como possível vetor no estado de São Paulo (Galvis-Ovallos et al, 2017).

Outro cenário desafiador é o controle da leishmaniose visceral nos reservatórios não humanos pois diversos mamíferos podem ter esse papel. Existem relatos de que roedores e animais sinantrópicos como gambás poderiam ser importantes reservatórios, bem como o elo na cadeia dessa transformação de uma enfermidade de ciclo silverstre/rural para urbano (Quinnell & Courtenay 2009; Carranza-Tamayo et al. 2016).

Nesse cenário de controle e combate à LV, é importante salientar que o cão é reconhecidamente o principal reservatório em meio urbano. Existem

diversos estudos que apontam esse fato como fator de risco para a ocorrência de LVH e correlação da presença de cães infectados com seres humanos portadores dessa enfermidade (Barata et al. 2013; de Araújo et al. 2013; Barbosa 2016; Oryan & Akbari 2016; Sevá et al. 2016; Ursine et al. 2016b; Figueiredo et al. 2017; Bsrat et al. 2018; Rocha et al. 2018). Contudo ainda existem inúmeras e fortes críticas contra a política de eutanásia de cães soropositivos, sejam elas a respeito da sua eficiência, da capacidade real de detecção dos cães soropositivos, alterações da estrutura populacional canina, ou até mesmo em razão de motivos ético-morais (Werneck 2014; Werneck et al. 2014a; Machado et al. 2016; Da Silva et al. 2017; Dantas-Torres et al. 2019).

Nesse sentido, ressaltam-se os inúmeros trabalhos que discutem a efetividade da detecção de cães com LVC (Travi 2014; Werneck 2014a; Werneck et al. 2014b; Romero & Boelaert 2010; Peixoto et al. 2015) bem como os reais benefícios da adoção da prática de eutanásia desses cães soropositivos (Courtenay et al. 2002; Nunes et al. 2008; Romero & Boelaert, 2010; Vulpiani et al. 2011; Costa et al. 2013; Travi, 2014; Gouvêa et al., 2016).

A essa discussão deve-se ainda acrescentar o fato de que cães têm sido detectados como positivos para leishmaniose em áreas que eram consideradas indenes, nas quais não há relato de casos humanos (Quinnell & Courtenay, 2009; Castro-Júnior et al. 2014; Constantino et al. 2014; D'Andrea et al. 2015; Abrantes et al. 2016; Ursine et al. 2016; Soccol et al. 2017). E em áreas que eram consideradas controladas e as medidas foram descontinuadas, casos caninos também têm sido detectados (Leal et al. 2018).

Apesar de toda essa problemática em torno do cão enquanto reservatório, existem diversos problemas no controle da LVH, como um todo. Mesmo tendo a descentralização do SUS aumentado a participação da comunidade, o diagnóstico e adesão ao tratamento foram prejudicados por causa de deficiências na infraestrutura necessária para atender a complexidade da LVH (Menon et al. 2016).

Com efeito, a LV é considerada uma doença focal, dependente de fatores socioeconômicos locais. Nesse sentido, em especial para possibilitar o diagnóstico com nível local, deve-se estabelecer um equilíbrio entre o governo e a comunidade local para que as ferramentas de controle e os programas sejam eficientes (Menon et al. 2016).

1.2 Leishmaniose visceral canina (LVC): sinais clínicos e imunopatologia

A apresentação clínica da LVC é complexa e difícil de ser definida com exatidão, por ser extremamente variada devido aos fatores que podem influenciar o desenvolvimento dessa enfermidade. Dentre esses, a multiplicidade de órgãos que podem ser afetados, as características patogênicas e a diversidade de sinais que a *Leishmania infantum* pode provocar, a resposta imunológica do animal, a variabilidade do período de incubação, e a presença de outras doenças com espectro clínico similar ou que se comportam como coinfeções (Vulpiani et al. 2011; Solano-Gallego et al. 2011; Gharbi et al. 2015).

No entanto, pode-se dizer que a resposta à infecção se inicia com a inoculação de promastigotas metacíclicos na pele do animal por meio da picada do vetor (Lipoldová & Demant, 2006; Gharbi et al. 2015). Nesse ponto, começam a ocorrer reações-chave que determinarão a susceptibilidade ou a resistência do animal à infecção, a depender da capacidade da resposta imune inata para a presença dos promastigotas metacíclicos na pele. Isto é, uma resposta adequada nessa etapa influenciará a qualidade da apresentação de antígeno e posteriormente a ativação de células Th1 (T *helper* tipo 1) com efeito protetor (Papadogiannakis & Koutinas, 2015).

Dessa forma, a capacidade de resistir ou de desenvolver a doença depende da capacidade de desenvolver uma resposta imune celular, com predominância de linfócitos Th1. Quando isso não ocorre, o organismo, de uma forma falsamente compensatória, exibe uma grande proliferação de

linfócitos B, o que explica a linfadenomegalia generalizada, esplenomegalia e hiperglobulinemia que têm caracterizado a doença (Vulpiani et al., 2011; Solano-Gallego et al., 2011; Koutinas and Koutinas, 2014; Almeida et al., 2017). Portanto, quando a resposta imunológica apresenta esse perfil humoral, isto é, predominância do tipo Th2 (*T helper* tipo 2), com grande atividade de plasmócitos, o animal apresenta alta titulação sorológica, e alta carga parasitária (Solano-Gallego et al. 2011; Koutinas & Koutinas 2014; Gharbi et al. 2015; Bruno et al. 2019). Portanto, quando o animal, apesar de infectado, está clinicamente saudável, ele apresenta uma resposta imune celular com predominância de Th1. Nesse quadro, o animal apresenta uma baixa titulação nos testes sorológicos, bem como uma baixa carga parasitária (Solano-Gallego et al. 2011; Koutinas and Koutinas 2014; Gharbi et al. 2015; Bruno et al. 2019).

Em vista da diversidade de mecanismos imunológicos que podem estar envolvidos para a resposta imunológica do animal se apresentar como predominantemente Th1 ou Th2, a progressão dessa enfermidade, após a inoculação, dá-se por um período de incubação de duração variada e que pode chegar até mais de 2 anos em condições experimentais (Oliveira et al. 1993).

Assim sendo, a evolução da LVC começa com sinais clínicos gerais inespecíficos, sendo que a linfadenomegalia pode ser o único sinal detectável durante algum tempo, seguido de perda de peso e apatia (Manzillo et al. 2013; Koutinas & Koutinas, 2014; Gharbi et al. 2015). O desenvolvimento de outros sinais, como os enumerados no Quadro 1, são consequência da deposição de imunocomplexos – devido à alta hiperglobulinemia policlonal – nos mais diversos tecidos e a evolução das lesões (Solano-Gallego et al. 2011; Koutinas & Koutinas 2014; Marques et al. 2018)

Quadro 1 – Sinais clínicos da LVC de acordo com o local afetado:

Locais afetados	Tipo de Manifestação Clínica	
Geral	<ul style="list-style-type: none"> • Linfadenomegalia • Emagrecimento • Letargia 	<ul style="list-style-type: none"> • Alterações de apetite • Claudicação • Atrofia muscular
Vísceras	<ul style="list-style-type: none"> • Hepatomegalia • Esplenomegalia • Poliúria e polidipsia 	<ul style="list-style-type: none"> • Diarréia (colite) • Mucosas hipocoradas (anemia)
Pele	<ul style="list-style-type: none"> • Alopecia • Dermatite esfoliativa • Dermatite ulcerativa • Dermatite nodular 	<ul style="list-style-type: none"> • Dermatite pustular • Onicogrifose • Hiperqueratose da trufa e coxins
Ocular	<ul style="list-style-type: none"> • Blefarite • Conjuntivite 	<ul style="list-style-type: none"> • Uveíte • Ceratite

(adaptado de Solano-Gallego et al., 2011)

Além dos sinais supracitados, também pode-se citar outros comprometimentos, menos frequentes, que o cão pode ter: desordens neuromusculares(Márquez et al. 2013; Melo et al. 2015; Oliveira et al. 2017); miocardite (Mendes et al. 2014) e distúrbios gastroentéricos crônicos (Ayala et al. 2017).

Portanto, pode-se afirmar que animais com uma exuberante sintomatologia costumam exibir titulações de anticorpos mais elevadas, conforme constatado por diversos autores (Solano-Gallego et al. 2011; Figueiredo et al. 2014; Koutinas & Koutinas 2014; Proverbio et al. 2014; Gharbi et al. 2015), bem como exibem uma maior carga parasitária no sangue periférico e tecidos (Torrecilha et al. 2016a). Além disso, o trabalho de Torrecilha et al. (2017) demonstrou uma correlação positiva entre o escore sintomatológico e a carga parasitária, reforçando assim o entendimento geral de que animais sintomáticos em geral exibem maior carga parasitária e titulação de anticorpos

Alguns pesquisadores utilizaram uma escala de sinais clínicos como uma ferramenta auxiliar de diagnóstico e prognóstico (Coura-Vital et al.

2013; Ribeiro et al. 2017; Figueiredo et al. 2014; Gouvêa et al. 2016), chegando a demonstrar que o uso de escore clínico poderia ser uma ferramenta de diagnóstica, principalmente em localidades mais isoladas com dificuldade de acesso às técnicas de diagnóstico (Gouvêa et al. 2016; Ribeiro et al. 2017). Ou até mesmo testes laboratoriais de rotina, como dosagem de proteínas da fase aguda ou avaliação de proteinúria, como meios de monitorar o tratamento específico e o prognóstico desses cães (Ceron et al. 2018; Paltrinieri et al. 2018; Bruno et al. 2019).

Ainda assim, não é recomendável que o diagnóstico seja realizado apenas com base nos sinais clínicos identificados no animal. Vários trabalhos demonstraram que algumas doenças concomitantes de outra etiologia podem influenciar no desenvolvimento dos sinais (WHO 2010; Tommasi et al. 2014; Zanette et al. 2014; Proboste et al. 2015; Ribeiro et al. 2017; Toepp et al. 2019). Além disso, é de extrema importância realizar a correta detecção dos animais assintomáticos, pois, apesar de estarem desenvolvendo algum tipo de resposta imunológica que controla a carga parasitária, são esses animais que podem estar agindo como fator de manutenção da enfermidade na população (Abbehusen et al. 2017; Almeida et al. 2017; Esteva et al. 2017).

Portanto, o diagnóstico final da LVC é realmente complexo, sendo hoje aceito que, para se chegar a ele com segurança, deve-se lançar mão de mais de uma prova laboratorial (Vulpiani et al., 2011; Solano-Gallego et al., 2011; Faria & Andrade, 2012; Gharbi et al., 2015; Papadogiannakis & Koutinas, 2015; Peixoto et al., 2015).

1.3 Diagnóstico da LVC

Uma prova diagnóstica ideal deve ser de execução simples e acurácia elevada, comprovada consistentemente em mais de um estudo e nos diversos cenários onde o diagnóstico se faz necessário (Faria & Andrade, 2012). Para a LVC, esse teste diagnóstico ideal ainda não existe, mesmo

com a atual diversidade de técnicas utilizadas, conforme o quadro abaixo ilustra, e mesmo com avanços tecnológicos.

Quadro 2 - Técnicas diagnósticas utilizadas (comercialmente ou em laboratórios de pesquisa) para o diagnóstico da LVC

Testes sorológicos	Parasitologia	Deteção de DNA
<ul style="list-style-type: none"> • Ensaio Imunoenzimático - ELISA • Imunofluorescência indireta - IFI • Teste de aglutinação direta - DAT • Imunocromatográficos rápidos • <i>Western blot</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Pesquisa direta (esfregaço de pele, aspirados de baço, medula óssea, linfonodo...) • Histopatologia • Imunohistoquímica • Cultura do parasito 	<ul style="list-style-type: none"> • Reação da cadeia da polimerase - PCR com diferentes tipos de iniciadores (convencional ou quantitativa) • Hibridização com sondas específicas

Atualmente, o MS preconiza para o diagnóstico da LVC o uso em série de dois testes sorológicos (Brasil, 2011): o Teste TR-DPP® (Biomanguinhos), como teste de triagem, e o teste imunoenzimático ELISA EIE® (Biomanguinhos), como confirmatório. O primeiro teste é uma prova qualitativa feita com imunocromatografia rápida de duplo percurso que se utiliza de antígenos recombinantes rk9, rk26 e rk39 de *Leishmania infantum* (Schubach, 2011). Já o outro consiste em um teste imunoenzimático em que se mede a reação dos anticorpos de soro de cães com antígenos de *Leishmania major like* adsorvidos em placas com o auxílio de uma anti-imunoglobulina de cão, marcada com a enzima peroxidase (Bio-Manguinhos 2014).

O uso do TR-DPP® como prova de triagem recebe algumas críticas, pois, apesar de ser prático, qualitativo, de fácil execução, e confiável, carece de sensibilidade adequada para detectar a infecção assintomática, tendomelhor desempenho em cães sintomáticos (Schubach et al. 2014; Larson et al. 2016; Figueiredo et al. 2018). Além disso, existem evidências de que haveria ganhos de qualidade diagnóstica e de custos quando usado

como teste confirmatório, ao invés de teste de triagem (Coura-Vital et al. 2014; Laurenti et al. 2014).

Existem ainda mais dúvidas sobre a capacidade dos testes recomendados pelo MS em detectar os animais infectados que permanecem assintomáticos e, principalmente, se os animais infectados representam um risco real para a transmissão da doença (Romero & Boelaert, 2010; Laranjeira et al. 2014; Travi, 2014; Werneck, 2014; Werneck et al. 2014a; D'Andrea et al. 2015; Peixoto et al. 2015; Lopes et al. 2017). Em estudo recente, realizado em 974 cães, foi constatado que 1 de cada 5 cães soronegativos estava infectado e não foi detectado pelo programa de controle (Lopes et al. 2017), o que reforça ainda mais a necessidade de aprimorar a acurácia dos testes principalmente para a população de cães assintomáticos.

Apesar de todo o desenvolvimento recente em relação a testes diagnósticos, e das boas recomendações para seu uso em animais assintomáticos (Larson et al. 2016; Paz et al. 2018), eles falham por não identificar os cães infectados, tendo um desempenho superior para detectar os cães doentes que exibem uma maior titulação de anticorpos no sangue periférico, bem como maior carga parasitária (Solano-Gallego et al., 2011; Figueiredo et al., 2014; Koutinas & Koutinas, 2014; Proverbio et al., 2014; Gharbi et al., 2015; Torrecilha et al., 2016a). Assim, permanece aberta a questão sobre como identificar cães portadores e cães doentes. O método ideal seria um que soubesse identificar os cães nos primeiros estágios da infecção. Existem alguns novos protocolos que estão sendo desenvolvidos, como o DAT-Canis (Oliveira et al. 2016), o ELISA PQ10/PQ20 (Faria et al., 2017), o ELISA rLci5 (Borja et al. 2018) e o imunossensor eletroquímico (Cordeiro et al. 2019).

Nesse sentido, a definição de um padrão de referência adequado poderia facilitar a realização de novos estudos de validação de testes. Pois como afirmado por Peixoto e colaboradores (2015), os estudos de validação de testes diagnósticos para LVC são escassos e não foram realizados em amostras amplamente representativas de toda a realidade brasileira.

Quanto aos outros testes disponíveis, existem vantagens e desvantagens no uso de cada um deles. Os testes sorológicos baseados na reação de imunofluorescência indireta eram realizados nas Unidades de Vigilância de Zoonoses. Apresentavam reações cruzadas com a resposta antigênica a outros tripanossomatídeos, além de ser trabalhosos e apresentar baixa reprodutibilidade entre laboratórios, o que levou a sua substituição pelo uso sequencial do TR-DPP® combinado com o EIE® (Laurenti, 2009; Brasil, 2011b; Mendonça et al. 2017).

Outros métodos que têm sido desenvolvidos com peptídeos hipotéticos com alta homologia entre espécimes de *Leishmania* tem apresentado resultados preliminares promissores com especificidade de 100% quando desafiados com soros de pacientes humanos infectados por *T. cruzi* e soro de cães com babesiose (Maria et al. 2017).

Ainda podemos citar outros testes sorológicos, como o uso de proteínas recombinantes (Farahmand & Nahrevanian, 2016), e o *western blot*, que tem sido mais utilizado em alguns segmentos específicos de pesquisa, como de avaliação de animais vacinados (Daneshvar et al. 2014).

A cultura de promastigotas, que é tida como uma técnica de referência pela OMS (WHO, 2010), é uma técnica que pode apresentar baixa sensibilidade, podendo requerer até um mês para se obter o resultado final, sendo trabalhosa e unicamente realizada em laboratórios de pesquisa (Solano-Gallego et al. 2011; Faria & Andrade, 2012; Gharbi et al. 2015).

Já a citologia e a histopatologia podem fornecer um resultado com alta especificidade, porém, possuem baixa sensibilidade frente a outras técnicas, havendo a necessidade de outros testes diagnósticos (Santos et al. 2014; Abrantes et al. 2016). Nesse cenário, a imunohistoquímica têm se mostrado mais sensível e específica, e, dependendo do anticorpo utilizado, pode ter capacidade de diferenciação entre espécies do parasito (Furtado et al. 2015). Entretanto, ainda é um método trabalhoso e demorado, e tem sido mais utilizado em pesquisas.

Testes moleculares, de diversos tipos, como, por exemplo, PCR convencional, PCR quantitativa, *NestedPCR*, *Loop-Mediated Isothermal*

Amplification (LAMP), podem fornecer resultados com uma maior sensibilidade do que a cito/histopatologia, identificando fragmentos de DNA com alta especificidade e também permitem quantificar a carga parasitária. Entretanto são técnicas que podem ser de alto custo, sofrem o risco de resultados falso positivos por contaminação e não diferenciam se o cão está doente ou só infectado, nem se ele constitui um risco para infectar o vetor (Faria & Andrade, 2012; Borja et al. 2016; Torrecilha et al. 2016). É válido destacar que existem vários alvos de DNA que podem ser utilizados para essa identificação, tais como: ITS1, SSU rDNA, kDNA, Hsp70, CytB, 18s RNA. Todos esses com finalidades de pesquisa distintas, sendo o alvo kDNA considerado o melhor alvo para triagem por ser altamente sensível (Paiva-Cavalcanti et al. 2015; Lopes et al. 2016; Rampazzo et al. 2017; Galluzzi et al. 2018).

Mesmo frente à diversidade de métodos disponíveis, ainda não existe um consenso sobre qual seria o melhor método para o diagnóstico da LVC. No entanto parece haver concordância em recomendar a combinação de dois ou mais métodos para confirmar o diagnóstico (Solano-Gallego et al. 2011; Koutinas & Koutinas, 2014; Gharbi et al. 2015; Arruda et al. 2016).

1.4 Fatores associados à ocorrência da LVC

O estudo dos fatores associados à ocorrência da LVC é uma ferramenta epidemiológica que pode completar as lacunas de conhecimento e fornecer subsídios para uma melhor estratégia de controle dessa enfermidade (Moreira et al. 2003; Silva et al. 2012; Belo et al. 2013).

Nesse sentido, o trabalho de Belo e colaboradores (2013) é primordial por apresentar uma revisão sistemática e metátese, que reuniu conhecimentos e trouxe resposta a algumas questões.

Esse trabalho explorou vários fatores associados ao desfecho doença LVC. Dentre os quais cabe ressaltar os seguintes: (i) sexo – apresentou grande heterogeneidade nos dados dos trabalhos analisados,

impossibilitando qualquer conclusão; (ii) idade – também foi um fator com grande heterogeneidade nos dados, apesar de ter havido certa tendência de associação com os cães mais velhos; (iii) comprimento do pelo – animais de pelagem curta apresentaram uma maior chance de adquirir a enfermidade; (iv) raça – a LVC foi mais frequentemente prevalente em cães de raça quando em comparação com os sem raça definida; (v) presença de áreas verdes próximas – diversas associações foram testadas (parques, matas, plantas e matérias orgânicas no quintal) e em todas observou-se associação positiva e estatisticamente significativa; (vi) restrição ao ambiente intradomiciliar – os cães que vivem restritos ao ambiente intradomiciliar têm menos chances de adquirir a doença quando comparados aos que permanecem em ambientes peridomiciliares, como quintais ou áreas semiurbanas; (vii) coabitação com galinhas – 5 trabalhos indicaram associação positiva entre LVC e coabitação de galinhas e 2 trabalhos veementemente demonstraram o oposto; (viii) coabitação com outros mamíferos – apesar de serem poucos os trabalhos, eles demonstraram associações positivas e significantes em relação à presença de raposas, porcos, cavalos e bois.

Infelizmente, o trabalho de Belo et al (2013) não pôde explorar outras associações, em razão de a escassez dos dados não permitir uma boa análise.

Em outros estudos, posteriores a esse de Belo et al (2013), diversas variáveis foram exploradas. Alguns desses estudos apresentaram outras associações, como o de (Leal et al. 2018), em que houve predominância em cães de grande porte em relação a pequenos – *Odds Ratio* OR 1,8 (IC95%1,5 a 2,3), e que dormir no quintal apresentou associação relevante - OR 2,6 (IC95%1,8 a 3,6). Estudos apontam que o sexo novamente não apresentou associação estatística significativa (Monteiro et al 2012; Coura-Vital et al. 2013; Felipe et al. 2014; Santos et al. 2017) - embora Ursine e colaboradores (2016a) que encontraram uma pequena predominância de machos, sem significância estatística, e Chagas (2017) que encontrou uma OR de 1,17(IC95% 1,04 a 1,31) para machos. Esses dois achados podem

ter sido fruto de um viés, pois a predominância de determinado sexo, em termos de fator de associação, pode sofrer influência da composição social dos proprietários da região estudada, especialmente quanto ao “uso” desses animais: companhia, guarda, pastoreio, etc. O que pode justificar que a variável sexo não tenha se apresentado significativa nos outros estudos.

A idade é uma característica difícil de ser explorada pelos pesquisadores; geralmente sendo usado como dado descritivo (Ursine et al. 2016a). Isto porque nem sempre é possível que o proprietário saiba a idade correta do animal. Além de que os próprios métodos de estimar a idade podem ser falhos e subjetivos, ou até mesmo o animal ser agressivo e não permitir o exame para a estimativa. Ainda assim, Figueiredo e colaboradores (2014) encontraram uma OR de 6,96 (IC95% 3,47 a 14,04), e Santos e colaboradores (2017) OR 1,46 (IC95% 1,02 a 2,10) em cães acima de 2 anos. Lopes et al. (2014) que estimou OR de 16,21 (IC95% 8,87 a 29,6) em cães mais velhos desde que nascidos no município estudado e Chagas (2017) OR 2,13 (IC95% 1,72 a 2,65) em cães acima de um ano. Esses resultados poderiam ser explicados pelo fato que animais mais velhos permanecem mais tempo expostos.

Em relação ao comprimento de pelagem, o trabalho de Coura-Vital et al. (2013) identificou um *Hazard Ratio* HR de 1,9 (IC95% 1,1 a 3,4), e Leal et al. (2018) identificaram uma OR 1,8 (IC95% 1,5 a 2,1), Chagas (2017) OR 2,56 (IC95% 2,15 a 3,05) todos sobre pelagem curta em relação a longa e Monteiro et al. (2012) identificou, em seu estudo, que a maior parte dos animais positivos eram de pelagem curta (51/63). Porém, esse é um ponto também difícil de ser trabalhado, pois a classificação do tamanho da pelagem é de difícil e às vezes subjetiva.

O estudo de exposições que possam estar mais distantes do evento, transcendendo a esfera especificamente biológica do organismo do animal ainda é um campo novo em pesquisa e muitos itens têm sido explorados, como: (i) o conhecimento dos proprietários sobre essa enfermidade, tanto em humanos quanto em cães; (iii) conscientização para importância dessa enfermidade (Felipe et al. 2014; Castro et al. 2016); (iv) a presença de

condições sanitárias adequadas abordando itens como esgoto, água tratada e recolhimento de lixo (Silva et al. 2012; Coura-Vital et al. 2013; Ursine et al. 2016a); (v) a presença de matéria orgânica, seja no quintal ou em alguma proximidade (Constantino et al. 2014); (vi) a presença condições climáticas e físicas favoráveis (precipitação e incidência solar); e (vii) a existência de rodovias e movimentação de pessoas e animais (Sevá et al. 2017a).

1.5 Epidemiologia, controle e prevenção da LVC

O controle da LVC é ponto chave no programa de controle da LVH, devido ao fato do cão ser considerado o principal reservatório em meio urbano. Para isso, é necessária a detecção precoce do cão infectado e a sua remoção por eutanásia, de acordo com o programa de controle de leishmanioses do Ministério da Saúde (Brasil, 2014b).

A detecção dos cães infectados é um ponto extremamente desafiador. Além de aspectos sobre a acurácia dos testes que são utilizados, esses testes são incapazes de separar cães portadores-assintomáticos de cães doentes, bem como de identificar os cães potencialmente infecciosos aos vetores (Romero & Boelaert, 2010; Laranjeira et al. 2014; Travi, 2014; Werneck, 2014; Werneck et al. 2014a; D'Andrea et al. 2015; Peixoto et al. 2015; Lopes et al. 2017). Outro problema desse tipo de controle, de ordem prática, é a não adesão da população a essa prática, que por muitas vezes não aceita entregar os animais infectados para eutanásia (Costa et al. 2016; Zuben & Donalísio 2016; Marcondes & Day 2019).

Para efeitos do programa de controle, o cão é classificado apenas como reagente e não reagente, e, uma vez identificado como reagente, aponta-se a necessidade de eutanásia, pois apesar de existir uma opção de tratamento com um medicamento autorizado pelo governo, essa não alcança a cura parasitológica e pode ser onerosa. Esse medicamento autorizado é importante destacar porque, por muito tempo, não era autorizado o tratamento de cães com medicamentos de uso humano ou não registrados no Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Brasil, 2008).

O intuito do estabelecimento dessa proibição foi prevenir o desenvolvimento de resistência aos medicamentos, como já foi observado em humanos (Kaur & Rajput, 2014; Geraldo et al. 2016), tendo em vista que não havia medicamentos de uso exclusivamente veterinário registrados no país.

A Nota Técnica Nº 11/2016/Cpv/Dfip/Sda/Gm/Mapa (Brasil, 2016b) autorizou o registro do produto Milteforan™ (miltefosine) da empresa Virbac Saúde Animal – o qual não é usado para o tratamento humano no Brasil. Dessa maneira, respeitando a Portaria Interministerial 1.426 de 11 de junho de 2008, passou a haver a opção de tratamento dos cães infectados, sendo que esse tratamento pode ser um meio de controlar a carga parasitária do animal e assim diminuir sua capacidade de atuar como reservatório em meio urbano.

A liberação desse medicamento não invalida a recomendação de eutanásia do animal, tendo em vista que o tratamento não é financeiramente acessível à toda população, bem como pode ser muito penoso ao animal (Travi, 2014; Reguera et al. 2016).

O medicamento, inicialmente concebido como um quimioterápico para combate de células cancerosas (Noli & Saridomichelakis, 2014 *apud* Hilgard et al. 1993), mostrou-se extremamente ativo contra amastigotas de *Leishmania infantum* (Farca et al 2012). Miltefosina, além de ser tóxica para os amastigotas, também estimula a imunidade celular, aumentando os níveis sanguíneos de IFN- γ , o que potencializa o seu efeito leishmanicida. No entanto, mesmo com todos esses benefícios, a miltefosina não consegue alcançar a cura parasitológica nos cães. Esse medicamento apenas diminui a carga parasitária e consegue melhora clínica dos cães (Nogueira et al. 2019). Assim, além do tratamento, é necessário realizar acompanhamento vitalício do animal e utilizar outras formas de controle da doença, como o uso de coleiras impregnadas com inseticidas repelentes e manutenção do animal em ambiente telado, especialmente em momentos de alta circulação do vetor (Reguera et al. 2016).

Além das perspectivas acerca do tratamento como ferramenta de controle da doença, outros dois meios também são explorados: a vacinação canina e o uso de inseticidas repelentes.

A vacinação, em teoria, seria uma excelente ferramenta de controle da LVC, pois poderia impactar positivamente o controle da LV em áreas endêmicas ao evitar que os animais adoeçam. Em teoria, a vacinação deveria induzir uma memória imunológica duradoura e com predominância de Th1 na resposta imune para conseguir controlar a infecção e diminuir a transmissibilidade para o vetor (Gradoni, 2015). Porém, a vacinação canina não afetaria a incidência de casos em outras espécies de hospedeiros (Sevá et al. 2017b).

Apesar dessas vantagens teóricas, para não prejudicar as ferramentas de diagnóstico, a vacina deveria deixar distinção sorológica para não se confundir cães vacinados com cães infectados, e assim evitar que cães saudáveis fossem eutanasiados (Testasicca et al. 2014; Campos et al. 2017a).

Atualmente, a vacina *LeishTec*® têm sua comercialização permitida no Brasil. É uma vacina recombinante feita com o antígeno A2 de *Leishmania*. Em um ensaio randomizado de campo em área endêmica, a eficácia foi de 80%(IC95% 37.6-94.1%) (Regina-Silva et al. 2016). Outro estudo forneceu evidências de que em área não endêmicas, cães vacinados com a *LeishTec* não soroconverteram, mesmo com diferentes tempos de avaliação (Campos et al. 2017a).

Outra medida profilática no combate a LVC é o uso de inseticidas de forma tópica – coleiras impregnadas, dispositivos *spot-on* ou *sprays* –, que agem evitando o repasto sanguíneo do vetor no animal, bem como sua sobrevivência, caso faça o repasto (Otranto & Dantas-Torres, 2013; Otranto et al. 2013; Reguera et al. 2016). Esses aparatos baseados em combinações de permetrina, deltametrina e fentation, em testes de campo alcançaram diferentes taxas de eficácia. Com destaque combinações como imidacloprid 10% com permetrina 50%, e imidacloprid 10% com flumetrin 4.5% que chegaram a 100% de eficácia em experimentos com seguimento de 2 anos

(Otranto et al. 2007, 2010, 2013). Tais merecem mais atenção como medida de controle por interromper a cadeia epidemiológica de transmissão (Travi et al. 2018).

No Brasil, estão sendo conduzidos testes com coleiras impregnadas com repelentes e os resultados são extremamente otimistas. O trabalho de (Coura-Vital et al. 2018) demonstrou que as coleiras podem ser efetivas para diminuir a incidência, e outro trabalho (Kazimoto et al. 2018) que o uso contínuo da coleira pode diminuir em até 53% o risco de adoecimento. Além desses trabalhos, em uma outra abordagem (Silva et al. 2018) que as regiões onde os cães usam coleiras, a abundância de vetores é menor.

Em trabalho de modelagem matemática, o uso da coleira foi o que apresentou a melhor eficácia: com efeito quando em uso de pelo menos 90% da população canina, pode diminuir a soro prevalência na população a quase zero. Isso porque o uso estratégico das coleiras impregnadas afeta a força de contágio dos cães pelo mosquito (Sevá et al. 2016, 2017b). A autora salienta que essa ferramenta seria mais facilmente aceita pela população e com menos problemas estratégicos de implantação como a vacinação e sem os problemas éticos causados pela eutanásia.

Além dos repelentes exógenos administrados como coleiras, produtos *spot-on*, existem também os repelentes endógenos, substâncias que quando administradas aos animais, seu resíduo no sangue pode ter ação sobre o ciclo de vida dos vetores. Substâncias essas, como ivermectina, moxidectina, espinosade, atuam matando o vetor após o repasto sanguíneo, ou matando as larvas. Porém, ainda faltam estudos de campo acerca do uso desses produtos em populações animais (Gomez & Picado, 2017; Gomez et al. 2018).

Assim sendo, reafirma-se a premissa de que a LVC é uma doença complexa e seu controle têm se provado uma tarefa árdua. E, apesar de todos os estudos, ainda existem lacunas na compreensão do processo de infecção e adoecimento e em como identificar corretamente cada etapa. Bem como que isso transcende os aspectos biológicos do indivíduo e está

integrado com seu ambiente, com os seus fatores associados que precisam mais estudos.

2. JUSTIFICATIVA

Para se compreender melhor como certas características ou fatores podem estar associados a ocorrência de uma doença, estudos são conduzidos em regiões endêmicas, onde há presença de todos os elementos necessários para que a cadeia de transmissão aconteça. Assim, uma região endêmica para leishmaniose visceral é definida quando há a presença do vetor e casos novos, em que não existe a possibilidade de terem sido infectados em outra localidade (Brasil., 2014a).

O Distrito Federal (DF) realizou a primeira notificação de LVH, de acordo com o SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificações) e em 2005, com os primeiros casos autóctones, se tornou endêmica para LV. Atualmente o DF conta com uma população sororeativa para leishmaniose visceral e têm a presença do vetor (Carranza-Tamayo et al. 2010, 2016; Brasil 2013a; Sousa et al. 2015).

O DF é uma unidade federativa organizada atualmente em 31 regiões administrativas (RAs) (Brasil 1993). As questões de saúde pública são de responsabilidade da Secretaria de Saúde do DF (SES-DF) e a responsabilidade para o cumprimento das determinações do Programa de Controle das Leishmanioses é da Subsecretaria de Vigilância Epidemiológica e suas diretorias. A Diretoria de Vigilância Epidemiológica do DF (DIVEP-DF) que realiza a vigilância epidemiológica dos casos humanos, o Laboratório Central do DF (LACEN-DF) que realiza o diagnóstico laboratorial dos casos humanos e a Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde (DIVAL-DF) que realiza a vigilância e controle de vetores e reservatórios. Portanto, a DIVAL-DF identifica os casos de LVC no âmbito do DF (Brasil 2000; Silva 2018). Apesar de ações de vigilância serem

realizadas, tanto nas modalidades ativa e passiva, a LVC continua a ser transmitida em suas áreas endêmicas (Silva 2018).

Dentre as regiões endêmicas do DF, a Fercal é a “terceira” colocada, com 904 casos de LVC nos anos de 2004 a 2015. Com um histórico de casos autóctones e com a presença do vetor confirmada (Carranza-Tamayo et al. 2010; Brasil 2013b) a região da Fercal foi alvo de um estudo de prevalência de infecção humana por *Leishmania* spp. que identificou 33,28% (IC95% 29,87 a 36,84%) da população com idade de 2 a 14 anos com evidência de contato com esse protozoário, por meio da aplicação da intradermoreação de Montenegro (Carranza-Tamayo et al. 2016).

A Fercal, que é a XXXI RA, apesar de existir há mais de 60 anos, foi desmembrada de Sobradinho II e constituída como RA apenas em 2012. É uma importante região industrial com fábricas e usinas de cimento, asfalto e mineradoras. Possui uma população com características diferenciadas das outras RAs, com uma população estável. Tanto que, no ano de 2013, com uma população estimada em 8746, a maior parte (82,98%) nunca se mudou da Fercal, sendo o local de trabalho da maioria na própria RA (53,64%) ou em RAs próximas (14,44%). Essa realidade pouco mudou desde a pesquisa distrital amostral por domicílios do ano de 2013 (Brasil 2013, 2015).

Considerando a escassez de estudos que abordam a influência de fatores socioeconômicos e comportamentais que aumentam a probabilidade de os cães adoecerem ou se infectarem; bem como a presença de uma população de baixa mobilidade ao longo do território do DF e suscetível à leishmaniose visceral, proporciona um local ideal para a condução de um estudo de fatores associados à ocorrência da LVC.

Na condução de qualquer estudo a respeito da LVC o diagnóstico de LVC é um desafio, tendo em vista também a escassez de estudos de acurácia dos testes disponíveis, assim como a dificuldade de se realizar estudos de validação dos testes pela ausência de um padrão de referência adequado. Em condições ideais, o método diagnóstico para LVC deveria detectar os cães infectados e ainda informar a potencialidade do animal para

infectar o vetor, tornando-se relevante para a transmissão da infecção para a população humana.

O uso de mais de um método diagnóstico, para fins de execução da política pública de monitorar a prevalência de infecção na população canina, encarece o programa de controle. Ainda, a utilização de métodos de execução complexa ou dependentes de tecnologia laboratorial dificulta o uso em localidades mais remotas. Dessa forma, o teste de soroglutinação em placa, *DAT-Canis*, desenvolvido no Instituto Rene Rachou (Fiocruz, Minas Gerais), pode ser uma ferramenta promissora para o programa de controle. Desenvolvido com antígenos brutos de *Leishmania infantum*, o kit permite realizar 480 reações qualitativas ou 80 reações quantitativas, com baixo custo (US\$0,44 para reações qualitativas) e que em estudos preliminares apresentou boa acurácia: sensibilidade 97,1% (IC95% 83 a 99,8), especificidade 97% (IC95% 88,5 a 99,5), sendo necessários estudos que avaliem resultados frente a outras técnicas diagnósticas, bem como a sua capacidade de detecção de cães infectados que permanecem assintomáticos (Oliveira et al. 2016).

Portanto, estudos de prevalência e fatores associados poderiam esclarecer algumas das questões já aqui discutidas, tendo em mente a complexidade do cenário na Fercal para essa enfermidade, e a validação de um novo teste diagnóstico para LVC, com as características do teste *DAT-Canis*, pode contribuir para a simplificação das operações de controle da LVC.

3. OBJETIVOS

- Avaliar a acurácia dos testes TR-DPP (Biomanguinhos®), EIE-LVC (Biomanguinhos®), o ELISA rk39 (*in house*) e o teste *DAT-Canis* frente a um padrão de referência constituído por uma combinação de técnicas parasitológicas e técnicas moleculares;

- Estimar a prevalência de infecção e doença em uma população canina em uma área endêmica do Distrito Federal e;
- Estudar fatores associados à infecção canina.

4. MÉTODOS

4.1 Estudo de prevalência e dos fatores associados a LVC

4.1.1 Tipo de estudo

Estudo de prevalência, transversal descritivo e analítico

4.1.2 Local de execução do estudo

Coleta de dados e material biológico na XXXI Região Administrativa Fercal e análise nas dependências do Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical

Fercal é uma Região Administrativa localizada a aproximadamente 30 km da rodoviária do Plano Piloto. É considerada a primeira região operária do Distrito Federal, com suas duas indústrias de cimento. E toda sua “urbanização” está localizada em volta da Área de Proteção Ambiental – APA – Cafuringa, conforme imagem de satélite obtida via Google Earth demonstra no Anexo I.

A população humana da Fercal, conforme levantamento de 2013, é de 8.536 habitantes (Brasil 2013c), com base nisso, a população canina estimada é de 342 cães. Isso de acordo com a referência de que a população canina estimada de uma região corresponde a 4% da população humana (Bogel et al. 1990; WHO, 2010).

4.1.3 Amostragem

O tamanho da amostra de cães foi calculado por meio da ferramenta *Stat Calc* do Programa Epi Info (versão 7.2.0.1). Os parâmetros utilizados foram:

- Tamanho estimado da população canina = 342 cães
- Frequência esperada de infecção = 10%
 - Com base em trabalhos anteriores em que o percentual de positividade para LVC na Fercal oscilou entre 7 a 14% (Brasil, 2013; Chagas 2017; Silva 2018), e em orientações obtidas diretamente na DIVAL-DF, a frequência esperada de infecção foi estabelecida como 10%
- Margem de erro = 5%;
- Intervalo de confiança de 95%;
- Efeito de desenho de 1,5
 - Considerando que poderia haver efeito de conglomerado quando houvesse mais de um cão elegível na mesma residência, o efeito de desenho com a correção de 50% a mais no tamanho amostral pode ser suficiente para equilibrar o poder estatístico (Luiz and Magnanini 2000).
- Estimativa de perdas = 10%
- Tamanho amostral estimado = 160 cães.

4.1.4 Critérios de elegibilidade para compor a amostra

Foram elegíveis para participar animais maiores de quatro meses, cujos proprietários eram maiores de idade dispostos a ler e assinar o Termo de Livre Consentimento. Foram excluídos animais extremamente arredios ou com problemas de saúde que impossibilitassem a realização dos procedimentos diagnósticos sob sedação leve, tais como cardiopatia grave, convulsões, etc.

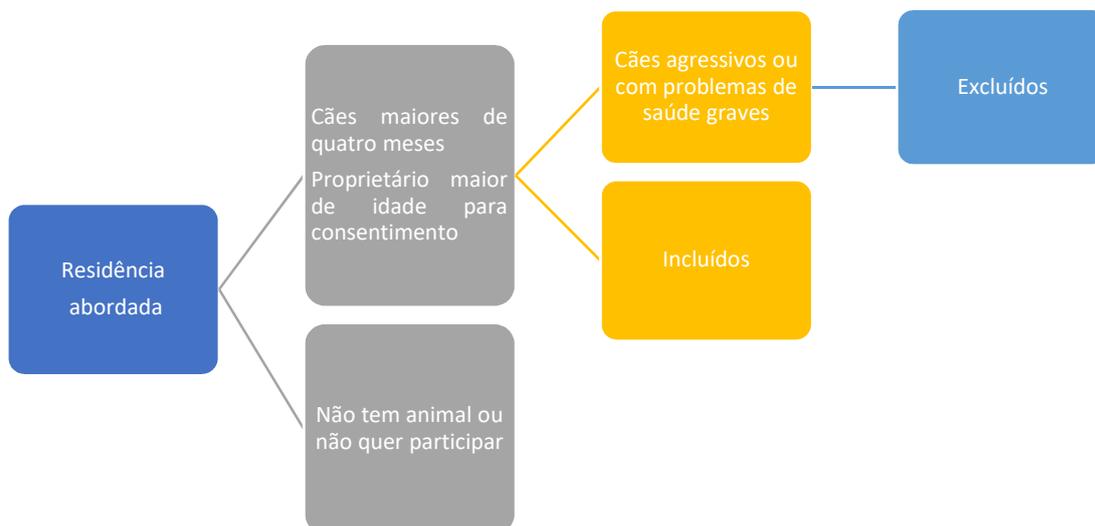


Figura 2 – Fluxograma de aplicação dos critérios de elegibilidade

4.1.5 Procedimento de amostragem

A coleta dos dados foi realizada de forma sistemática: a abordagem teve início a partir da residência da Fercal mais próxima ao Plano Piloto do Distrito Federal e obedeceu ao critério de coletar dados em apenas uma casa de cada quarteirão.

A residência era elegível quando reunia todos os critérios do item anterior. Nos casos em que a residência abordada não fosse elegível, a equipe se dirigia à próxima casa, e assim por diante, até que fosse encontrada uma elegível; após os procedimentos, a equipe dirigia-se ao próximo quarteirão em busca de uma nova residência elegível, conforme a figura 2 apresenta.

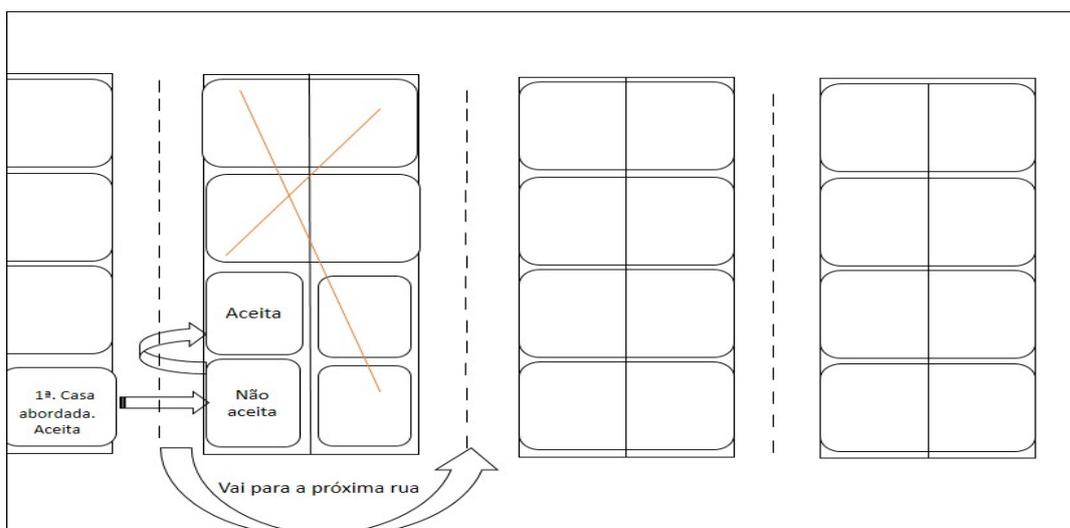


Figura 3 - Representação esquemática do sistema de seleção de residências

Houve quarteirões em que não foram encontrados animais ou a presença de seus proprietários, ou ainda em que não houve a aceitação de participação, de tal forma que nesses quarteirões não houve coleta de dados. De qualquer modo, todos os quarteirões foram percorridos pela equipe de coleta, de maneira que todo o território da Fercal foi representado na amostragem.

4.1.6 Coleta de dados

A abordagem iniciava-se com explicações sobre o projeto, sua importância, possíveis resultados e implicações. Isto é, eram orientados sobre todos os procedimentos que seriam realizados, possíveis riscos e benefícios, como acesso aos resultados dos exames. Em sequência, os proprietários assinavam um termo de consentimento livre e esclarecido e permitiam a coleta de sangue e medula óssea de seus animais. Após o proprietário aceitar a participação do projeto, foi identificado o local da residência por meio de coordenadas com o aplicativo *Locus Map* Versão 2.1.3 (disponível gratuitamente na *Google Play Store*).

Todos os procedimentos realizados, desde a coleta de informações a materiais biológicos foram realizadas de acordo com o fluxograma a seguir:

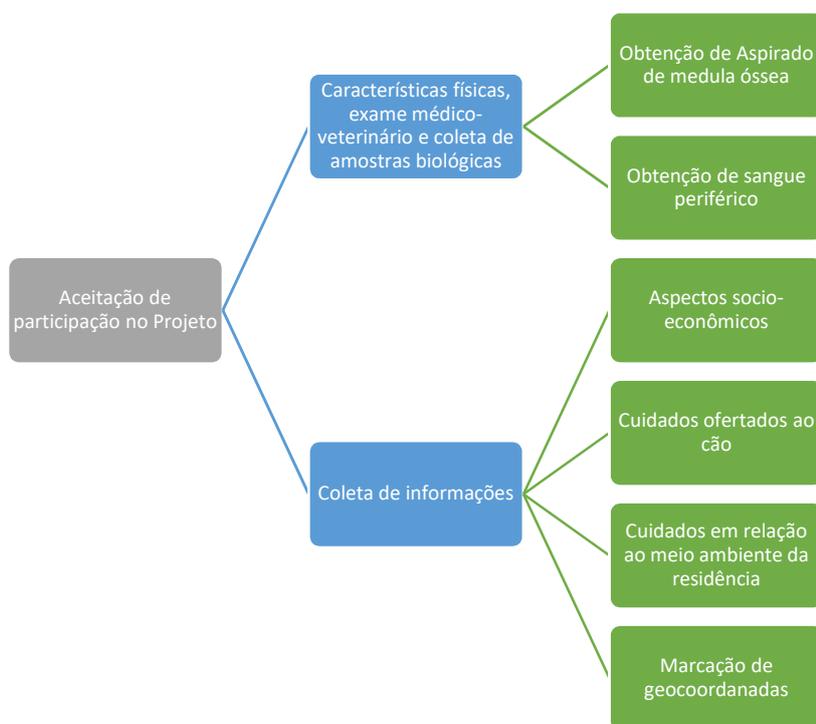


Figura 4 - Fluxograma de coleta de dados e de amostras biológicas

A avaliação física foi iniciada com a anotação das características do animal. O exame físico, foi realizado por Médico Veterinário e seguiu um sistema de escore clínico, adaptado do trabalho de Proverbio e colaboradores (2014) que pode variar de 0 a 46 pontos, sendo 46 a apresentação clínica máxima (Proverbio et al. 2014), apêndice I. A adaptação foi feita por meio de um ensaio piloto com dois médicos veterinários e 20 avaliações clínicas, essas adaptações consistiram em eliminar itens que não seriam possíveis de se identificar em apenas uma visita e sem apoio de exames laboratoriais como: poliúria, polidipsia, concentração de proteína na urina, processo de emagrecimento, variações de apetite e estado mental. As orientações sobre o preenchimento da ficha de avaliação clínica estão descritas no apêndice II.

O questionário, em seu primeiro bloco, abrange uma classificação do socioeconômica, de acordo com o preconizado pela Associação de Empresas de Pesquisa (ABEP 2012) que por meio de uma série de perguntas sobre posses, bens e escolaridade determina o poder aquisitivo e relaciona a renda da família com a classe social. Os quesitos que compõem o questionário estão descritos no apêndice III. Essa pontuação de 0 a 46 pontos classifica as famílias em classes dos cortes do critério Brasil conforme quadro abaixo:

Quadro 3 - Relação entre a classe econômica e a renda média bruta familiar

Relação com a renda		
Classe	Pontos	média bruta familiar em reais
A1	42-46	11.037
A2	35-41	6.006
B1	29-34	3.118
B2	23-28	1.865
C1	18-22	1.277
C2	14-17	895
D	8-13	895
E	0-7	895

Fonte: Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa (2012)

O bloco II do questionário abrange questões do cotidiano e o ambiente residencial. No último bloco (III) são abordados os cuidados com os cães, explorando pontos que indicam que tipo de cuidados são ofertados aos animais, contemplando alimentação, banho, vacinas, uso de produtos repelentes, visitas a médicos veterinários. Esses dois blocos de perguntas estão descritos no apêndice IV. E as instruções de preenchimento estão no apêndice V.

4.1.7 Coleta de Amostras biológicas

A coleta e análise do material biológico observou o fluxograma apresentado na Figura 4

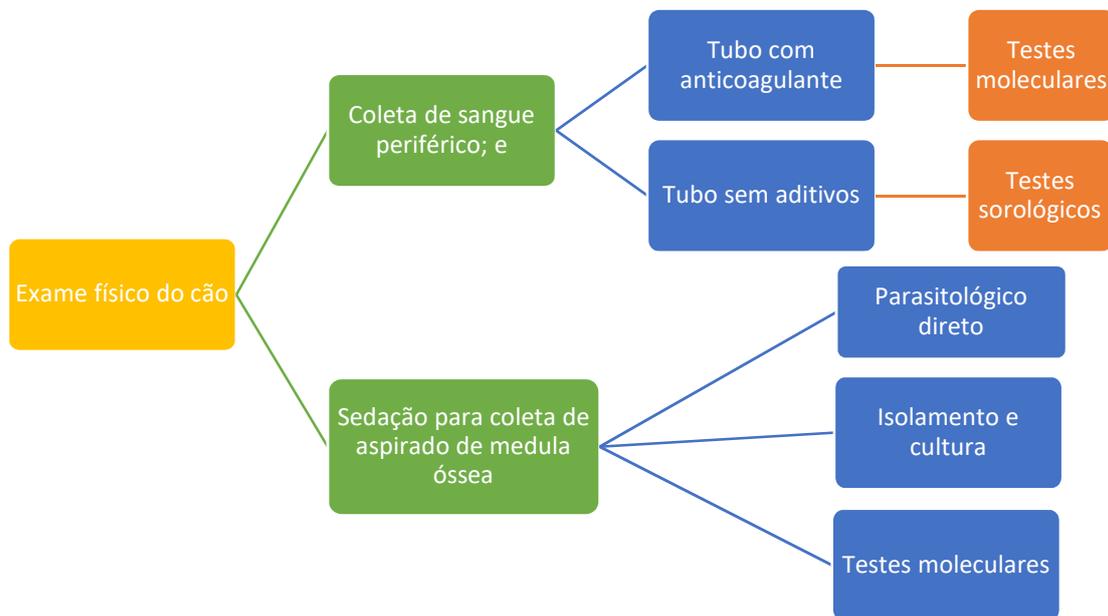


Figura 5 - Fluxograma de coleta de amostras e exames realizados em cada animal

Após o exame físico do cão, foi coletado sangue periférico (veia cefálica, veia safena ou veia jugular), com seringa de 3 mL e agulha 25x0,7 mm. O sangue coletado foi armazenado em dois tubos, um com anticoagulante EDTA para realização dos testes moleculares, e outro sem, para realização dos testes sorológicos.

Essas amostras foram transportadas sob refrigeração entre 4°C e 8°C até o Laboratório de Leishmanioses NMT/UnB. Imediatamente após a chegada no laboratório, o soro foi separado por centrifugação à 3000 rotações por minuto (rpm) durante 3 minutos. O sangue total e o soro foram

conservados a - 20°C até o momento da realização dos testes sorológicos ou moleculares no laboratório.

Como que em alguns cães poderia não ser possível a coleta de medula óssea por condições de saúde que impossibilitassem a sedação, padronizou-se a coleta de sangue antes da sedação.

A coleta do aspirado da medula óssea foi sempre realizada sob sedação. O local da punção foi o osso esterno, localizado em sua parte ventral, no manúbrio. A sedação foi feita com quetamina (8 mg/kg) associado a acepromazina (0,1 mg/kg) por via intramuscular. Após a sedação, os animais foram colocados sobre uma mesa de aço inoxidável para tricotomia e assepsia sequencialmente com água e sabão, álcool iodado e álcool 70%. A coleta foi realizada com seringa descartável de 20 mL e agulha calibre 40x1,2 mm.

4.1.8 Definições de caso e não caso de infecção

Foi considerado como caso de infecção o cão que cumpriu pelo menos um dos critérios abaixo:

- Resultado positivo no exame parasitológico direto;
- Resultado positivo na cultura do parasito;
- Resultado positivo na PCR - ITS1;
- Resultado reagente nos testes TR DPP (Biomanguinhos®) e ELISA (EIE-LVC) (Biomanguinhos®) sequencialmente;
- Resultado reagente nos testes TR DPP (Biomanguinhos®) e ELISA (Rk39) sequencialmente;

Foi considerado como não caso o cão que apresentou resultados negativos em todos os esquemas diagnósticos mencionados acima.

4.1.9 Exames laboratoriais

4.1.9.1 Exame parasitológico direto

As lâminas de esfregaço de aspirado de medula óssea foram feitas imediatamente após a coleta, fixadas com metanol e acondicionadas para transporte.

No Laboratório de Leishmanioses essas lâminas foram coradas com Giemsa (Merck®) ou Panótico (Instant Prov, Laboratório NewProv) e foram observadas em microscópio ótico com óleo de imersão e aumento 1000x buscando-se identificar formas amastigotas (Jain, 1986).

Foram lidas pelo menos duas lâminas de cada animal, de acordo com os critérios estabelecidos para a técnica semiquantitativa de identificação de amastigotas, conforme descrito pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1984). Essa técnica consiste em se ler mil campos e se fazer uma estimativa de quantas amastigotas foram observadas por campo, conforme demonstrado no Quadro 4.

Quadro 4 - Grau de parasitismo em relação ao número médio de amastigotas identificados por campo

Grau de Parasitismo	Número médio de parasitas por campos examinados
0+	0 parasitos / 1000 campos
1+	1 a 9 parasitos /1000 campos
2+	1 a 9 parasitos / 100 campos
3+	1 a 9 parasitos / 10 campos
4+	1 a 9 parasitas / campo
5+	10 a 100 parasitas / campo
6+	> 100 parasitas / campo

Fonte: Adaptado de WHO (1984)

4.1.9.2 Exame de cultura e isolamento

A cultura foi realizada com uma gota do aspirado de medula óssea que foi inoculada em tubo com meio NNN previamente preparado de acordo com a protocolo adotada no Laboratório de Leishmanioses do NMT.

Esse preparo é feito em tubos *Vacutainer* onde se acrescenta 5mL de um preparado de ágar base nº 2 (DIFCO 0696-17), com sangue de coelho desfibrinado a 10% (adicionado após a fusão do ágar) e acrescido de

gentamicina (100µg/mL). Esses tubos são fechados com sua respectiva tampa de borracha, passam por teste de esterilidade (um tubo é colocado na estufa por 24 horas para observar se cresce algum contaminante) e são armazenados em 5 a 8°C até o momento do seu uso.

Cada amostra foi inoculada em duplicata e eram avaliadas a cada 2 dias, em microscópio ótico invertido, em busca de movimentação típica que indicasse a presença de promastigotas de *Leishmania* durante o período de 30 dias (Romero et al. 1999).

4.1.9.3 Exames sorológicos

Os exames sorológicos TR DPP (Biomanguinhos®) e ELISA (EIE-LVC) (Biomanguinhos®) foram realizados pela DIVAL/DF, sendo que para esse estudo, os dois testes foram sempre realizados.

O TR DPP consiste de uma composição de antígenos recombinantes *Leishmania k28* unidos a uma membrana de nitrocelulose para detecção de anticorpos específicos para *Leishmania* em sangue total, soro e plasma. A realização consiste em se aplicar 5µL da amostra que é aplicado no poço número 1, sendo em seguida adicionada duas gotas do tampão. Após cinco minutos são aplicadas quatro gotas do mesmo tampão no segundo poço e aguarda-se 15 minutos para a leitura. O teste é positivo quando aparecem duas bandas vermelhas no leitor, uma referente ao controle e outra a amostra testada. Quando apenas a banda do controle aparece, o teste é considerado negativo. Quando nenhuma banda é visualizada o teste é considerado inválido e deve ser repetido (Schubach, 2011).

O teste EIE-ELISA é realizado em placas com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major-like* que estão adsorvidos aos poços para detecção de anticorpos específicos. O teste é iniciado com a diluição dos controles e das amostras na proporção de 1:100 que são aplicados nos poços. Após 30 minutos de incubação a 37°C é aplicado 100µL tampão de lavagem e retirado (6x), depois é aplicado 100µL do conjugado e 100µL do substrato. Segue incubado por mais 30 minutos ao abrigo da luz e a reação

é bloqueada com 50 µL de ácido sulfúrico. A placa então é lida em espectrofotômetro em 450nm e um ponto de corte é calculado com base na densidade ótica dos orifícios dos controles negativos. E o resultado é reagente ou não reagente.

O teste ELISA rk39 foi realizado nas instalações dos Laboratórios do Instituto de Pesquisa René-Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) em Belo Horizonte. Em um primeiro momento as placas Nunc-maxi sorp foram sensibilizadas um tampão de carbonato/bicarbonato com antígenos rk39¹ (solução de Ag rk39 estava com concentração ótima na titulação em bloco de 50ng/well e a diluição foi feita: [50ng] - 51948µL de tampão carb/bic + 52µ de Ag de rK39).

Essa sensibilização foi realizada com a aplicação de 50µL da solução em cada poço, com cuidado para evitar a formação de bolhas e as placas são armazenadas em câmara úmida em geladeira (2 a 8°C) *overnight*. Depois foram congeladas à -20°C para o uso posterior.

No dia seguinte, a placa é colocada em temperatura ambiente enquanto é preparada uma solução de leite desnatado 5% em PBS Tween 0,05%, que após levemente aquecido (10 segundos) e filtrado em gaze, foi utilizado para lavar todos os poços (300µL/poço), num total de 4 vezes. Posteriormente, foi adicionado 200µL de leite 5% em cada poço, incubado por 2 horas em câmara úmida a 37°C e, ao fim desse período, as placas foram lavadas.

Agora com as placas já sensibilizadas, 2µL de cada amostra de soro sanguíneo foi diluído em 198µL de leite 1% (em PBS Tween 0,05%) e foram aplicados 50µL em duplicata nas placas de acordo com o seguinte esquema:

¹ Ag rK39- A foi uma generosa doação de S.G. Reed, Infectious Disease Research Institute, Seattle, WA, USA

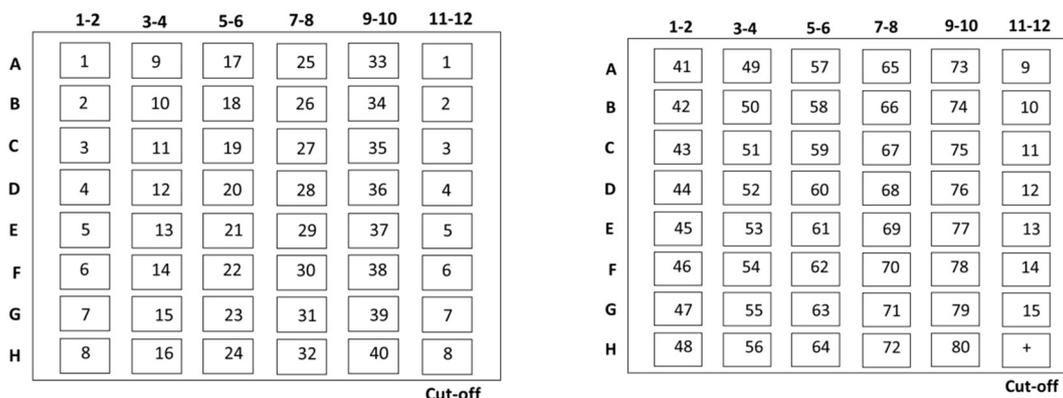


Figura 6 - Representação esquemática da aplicação de soro nas placas para realização do ELISA rk39, Belo Horizonte, 2017

Com a aplicação dos soros realizada, as placas foram incubadas 1 hora em câmara úmida à 37°C e depois lavadas. Em seguida foram aplicados 50µL do conjugado (IgG canino conjugado com peroxidase diluído na proporção 1/50.000 µL). As placas foram incubadas novamente por 1 hora em câmara úmida à 37°C e novamente lavadas.

A revelação foi realizada com 50µL de Tetrametilbenzidina em cada poço, deixando reagir por 5 minutos no escuro, e, posteriormente bloqueada com 50µL de solução de ácido sulfúrico 1N em cada poço. E a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450/620nm. E o *cut-off* foi calculado com a diferença de absorbância entre as amostras duplicatas em relação ao erro padrão.

4.1.9.4 Testes moleculares

A reação com alvo de DNA de cinetoplasto, o kDNA (Rodgers et al. 1990) foi escolhida para realizar a triagem das amostras e a reação com alvo de ITS ribossomal, o gene *Internal transcribed Spacer* (Talmi-Frank et al. 2010) foi para confirmar a presença de DNA de *Leishmania* na amostra.

Extração de DNA

As amostras de sangue canino com EDTA foram mantidas em -20°C até o processamento nas dependências do Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília.

A extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) foi feita com o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI, Estados Unidos da América). O procedimento de extração decorre da seguinte maneira 300µL da amostra foram aplicados em um microtubo de 1,5 mL que continha 900µL de solução de lise celular. Esse material foi ressuspensionado com auxílio de um micropipetador e homogeneizado por inversão e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida os microtubos foram centrifugados a 13000rpm por 30 segundos. O material se apresentou separado em duas fases, uma densa no fundo do tubo e um sobrenadante translúcido. Esse sobrenadante foi descartado e adicionou-se mais 300 µL de solução de lise celular, repetindo-se a incubação e centrifugação. Novamente obteve-se duas fases no microtubo, sendo o sobrenadante descartado de novo.

Após essas etapas, foram adicionados 300 µL de solução de lise nuclear ao microtubo, ressuspensionando o pellet com o auxílio de um micropipetador. Em seguida o material foi homogeneizado em vórtex por 30 segundos e incubado a 37°C por 15 minutos. Posteriormente adicionou-se 30 µL da solução de precipitação de proteínas, e levado ao vórtex por 30 segundos e centrifugado a 13000 rpm por 3 minutos. Ao final dessas etapas se obteve-se um pellet avermelhado grosso, contendo as proteínas lisadas e um sobrenadante translúcido.

Desse sobrenadante foram transferidos 400 µL para um outro microtubo, capacidade 1,5mL, contendo 300 µL de isopropanol 100%. Esse novo microtubo, com o sobrenadante e o isopropanol foi misturado por inversão (cerca de 50x) até visualização de fios brancos de DNA. Centrifugados a 13000 rpm por 1 minuto, o sobrenadante foi desprezado e o pellet de DNA foi lavado com etanol a 70%. Novamente centrifugado a 13000rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi desprezado. Os microtubos

foram invertidos em papel filtro para secagem do *pellet*, por 15 minutos em temperatura ambiente. Finalmente acrescentou-se 100 µL de solução de hidratação, e os microtubos foram postos em geladeira, *overnight*, para completa hidratação do DNA, para que finalmente pudessem ser submetidas ao processo de amplificação.

Em cada extração foi feito um controle negativo (branco) para garantir que não houveram contaminações no processo.

Amplificação da região conservada de kDNA de *Leishmania*

A reação da cadeia da polimerase para detecção de kDNA foi realizada com iniciadores (*primers*) [BW-B: 5' CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC 3'; FW: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3'; BW- CA: 5' GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC 3' (Ampuero et al. 2009) que amplificam 120 pares de base (pb) da região conservada de kDNA que identifica espécimes do gênero *Leishmania*.

Em cada reação foram utilizados controle positivos que foram elaborados com culturas de referência que estavam em crescimento logarítmico (10^6) e foram submetidas a extração de DNA com o mesmo kit *Wizard Promega*. Os controles positivos foram *Leishmania infantum* (MCER/BR/79/M6445), *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/75/M2904) e *Leishmania brasiliensis* (IFLA/BR/67/PH8). Como controle negativo foi utilizado o “branco” da extração de DNA.

Tabela 1 - Solução de Master Mix para PCR de kDNA

Reagente	Concentração	Volume por reação em µL
H ₂ O	---	3,3
MgCl ₂	25mM	0,4
Primer FW	1,2µM	1,0
Primer BW-B/BW-CA	0,6µM	1,0
dNTPs	2mM	1,0
Tampão	5X	2,0
Taq DNA Polimerase	5u/µL	0,3
DNA	--	1 µL

As reações foram feitas em termociclador Techne FTC-PLUS (Bibby Scientific LTD (Reino Unido), com a seguinte programação: preaquecimento a 105°C, desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 35 Ciclos (aquecimento 95°C por 30 segundos, anelamento 64°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos), extensão final de 72°C por 5 minutos.

Amplificação gene ITS1

A reação de ITS foi feita com os primers desenhados no trabalho de (Talmi-Frank et al. 2010) com ITS-219F (AGC TGG ATC ATT TTC CGA TG) e ITS-219R (ATC GCG ACA CGT TAT GTG AG) e o amplicon é de 265pb. Essa amplificação é feita com um volume total de 25µL sendo 3µL de DNA. A mistura padrão está descrita na tabela abaixo:

Tabela 2 - Solução de Master Mix para PCR de ITS1

Reagente	Concentração	Volume por reação em µL
<i>H₂O</i>	---	14,75
<i>MgCl₂</i>	25mM	0,75
<i>ITS-219F</i>	40nM	0,5
<i>ITS-219R</i>	40nM	0,5
<i>dNTPs</i>	2mM	0,2
<i>Tampão</i>	5X	5,0
<i>Taq DNA Polimerase</i>	5u/µL	0,3
<i>DNA</i>	--	3 µL

Para esse seguimento de PCRs foi utilizado como controle positivo DNA extraído de *Leishmania infantum* (MCER/BR/79/M6445) em crescimento logaritmo (10^6) e como controle negativo foi utilizado água milliQ.

Os ciclos foram realizados em termociclador (Techne FTC-PLUS Bibby Scientific LTD, Reino Unido), com a seguinte programação: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 40 Ciclos (aquecimento 95°C por

30 segundos, anelamento 57°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos), extensão final de 72°C por 5 minutos.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos da PCR foram estocados em 4°C até o momento da eletroforese em gel de poliacrilamida.

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida a 7,5%, 150 volts, 75Amp por 90 minutos. Após essa etapa o gel foi fixado com 100mL de solução fixadora (5mL de ácido acético glacial e água ultrapura 1000mL) por 5 minutos e corado com 100mL de solução de prata a 0.2mL por 5 minutos. Lavado com água ultrapura e acrescido de solução reveladora 100mL (hidróxido de sódio a 3% com 800µL de formaldeído PA) por 15 minutos para revelação final.

4.1.10 Análise Estatística

Realizou-se a estatística descritiva e os dados foram tabulados com o programa Microsoft Excel.

Para a etapa analítica, as variáveis categóricas foram expressas em frequências e proporções e a associação com o desfecho de interesse de infecção canina foi avaliada por meio da aplicação dos testes de qui-quadrado ou Exato de Fisher. As variáveis contínuas foram avaliadas quanto a sua normalidade com o teste Kolmogorov-Smirnoff. Em seguida foram realizadas comparações de médias utilizando-se o teste T de Student para distribuições normais e por meio do teste não paramétrico de comparação de medianas Mann-Whitney para distribuições não normais. Posteriormente, para prepara-las para a análise multivariada, as variáveis contínuas foram submetidas a análise de quartis para determinação do ponto de corte que permitisse a sua transformação em variáveis categóricas dicotômicas.

Em sequência foi calculada a razão de prevalências com seus respectivos intervalos de confiança.

As variáveis que apresentaram associação estatística com valor de $p \leq 0,20$ foram escolhidas para fazerem parte do modelo regressivo hierárquico de Poisson, alternando as variáveis proximais, sendo um modelo com características do animal e outro com características do proprietário e seus cuidados para com o cão.

Finalmente, foram realizadas novas análises de regressão logística com todas variáveis que foram significantes nos três modelos anteriores.

4.1.11 Considerações éticas

O estudo foi aprovado na Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UnB sob o número UnBDoc 11253/2015 (Apêndice II). Em conformidade com a Lei 11.794 de 8 de Outubro de 2008 (Brasil 2008).

Como o Ministério da Saúde recomenda a eutanásia dos cães positivos para LVC, quando um animal era identificado como positivo, a DIVAL era notificada e os dados do animal, como aspectos físicos, endereço e telefone de contato do proprietário eram informados. E isso era esclarecido aos proprietários no momento de assinatura do TLC.

Essas amostras biológicas após as análises constituíram um banco de material biológico canino, acondicionado no Laboratório de Leishmanioses UnB, para futuras pesquisas.

4.2. Estudo de acurácia e confiabilidade do teste DAT-Canis

4.2.1 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo de fase II (Boleart et al. 2007; Banoo et al. 2010) para avaliação de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade do teste DAT-*Canis* desenvolvido pelo Centro de Pesquisas Rene-Rachou, FioCruz, Belo Horizonte.

4.2.2 Critério de elegibilidade dos pacientes e amostras utilizadas

As amostras utilizadas foram selecionadas de um banco de soros de cães residentes numa área endêmica do Distrito Federal que participaram de um estudo transversal que integra a linha de base de um estudo de coorte que tem por objetivo determinar o papel de fatores socioeconômicos e de cuidados dos proprietários sobre o risco de adquirir LVC. Os cães incluídos no estudo de coorte foram selecionados aleatoriamente e a coleta das amostras foi realizada no período de outubro 2015 a maio de 2017.

Os critérios de escolha das amostras do banco para o presente trabalho de validação consistiram em ter disponível soro suficiente para realização do teste DAT-Canis e ter realizado os outros testes sorológicos e todos os testes que compuseram o padrão de referência.

4.2.3 Execução do teste DAT-Canis

O kit teste de soroaglutinação DAT-Canis desenvolvido pelo CPqRR é composto por um frasco de antígeno liofilizado, que foi produzido com amastigotas de *Leishmania infantum*; um frasco com solução de reidratação; e um frasco com solução diluente.

O teste é executado com diluição seriada, sendo aceita como resultado reagente a partir da 4^a. diluição (1:800), sendo que as anteriores (1^a, 2^a e 3^a) são consideradas reações inespecíficas.

Todos os testes foram realizados em microplaca com 96 poços em fundo em V com dois sistemas de diluição. O primeiro sistema de diluição permite uma avaliação qualitativa, e foi realizado até a quarta diluição. O outro, realizado até a 11^a. diluição permite uma avaliação quantitativa, determinando a titulação dos anticorpos. Na modalidade qualitativa são avaliadas 22 amostras por placa, com um controle positivo e um negativo. As amostras que foram positivas foram retestadas na forma quantitativa, sendo que são testadas 8 amostras por placa e um controle negativo.

O primeiro passo foi a reidratação do frasco de antígenos com 5mL da solução de reidratação. A placa foi preparada colocando 99µL de solução

diluyente na primeira linha/coluna de diluição e 50µL nas outras linhas. Depois 1µL das amostras que foram testadas foi aplicado em cada um dos poços que continham 99µL de solução diluyente. Após homogeneizados 7x com o auxílio da pipeta, 50µL foi passado para próxima linha/coluna de diluição, até a última e a placa foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente.

Após essa incubação por uma hora, aplicou-se 50µL da solução de antígeno hidratado em cada poço, a placa foi homogeneizada por 7x com movimentos circulares e foi incubada em câmara escura por 18 horas. Após essa incubação que a placa foi feita a leitura da placa, a olho nu.

4.2.4 Padrão de referência

O padrão de referência constituído foi uma combinação de técnicas diagnósticas, sendo definido como **caso** o animal cuja amostra tivesse resultado positivo em pelo menos em um dos métodos descritos abaixo:

- Visualização de amastigotas no esfregaço de medula óssea;
- Isolamento de promastigotas em cultura de medula óssea;
- Amplificação de DNA do parasito utilizando alvo de kDNA, confirmado pela amplificação de DNA do parasito utilizando alvo de ITS1, no sangue periférico;
- Amplificação de DNA do parasito utilizando alvo de kDNA, confirmado pela amplificação de DNA do parasito utilizando alvo de ITS1, na medula óssea.
- Amplificação de DNA do parasito utilizando alvo de kDNA pela técnica de qPCR, no sangue ou na medula óssea.

Foi definido como **não-caso** o animal que tivesse todos os exames acima referidos com resultado negativo.

4.2.5 Execução dos testes do padrão de referência

Os exames que constituíram o padrão de referência foram realizados conforme descrito nos itens: 4.1.9.1 Exame parasitológico direto; 4.1.9.2 Exame de cultura e isolamento e 4.1.9.4 Testes moleculares.

4.2.5.1 Execução da qPCR

A PCR em tempo real (qPCR) foi realizada no Laboratório Multidisciplinar de Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina da UnB.

Foram utilizadas amostras de DNA obtidas tanto a partir do sangue total quanto da medula óssea. Os primers utilizados foram 5'-GGC CCA CTA TATTAC ACC AAC CCC-3' e 5'-GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA-3', conforme descrito por Pita-Pereira et al. (2012) com concentração de 1pmol de cada, com 1X do Power Green Syber Mix e 2µL de DNA, sendo o volume final de 20 µL.

O termociclador utilizado foi o Quant Studio 3 Applied da Biosystems. Design&Analysis Software com o ciclo: 95°C de temperatura inicial (atingida em 2 etapas do *Hold Stage*), 40 vezes (desnaturação 94°C por 15 segundos, anelamento 55°C por 40 segundos, extensão 72°C por 8 segundos). Os resultados foram codificados em positivo e negativo.

4.2.6 Outros exames sorológicos

Os resultados sorológicos dos testes TRDPP, EIE-ELISA e ELISA rk-39 foram disponibilizados junto com as amostras para essa análise e foram realizados conforme descrito no item 4.1.9.3

4.2.7 Avaliação clínica dos animais

Conforme descrito em item 4.1.6

4.2.8 Considerações éticas

Conforme item 4.1.13

5. RESULTADOS

5.1 Artigo 1: Aprimoramento do padrão de referência para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina: um desafio para atuais e futuros testes diagnósticos.

Publicado:

Teixeira, AIP. Silva, DM. Vital, T. Nitz, Nadjar et al. 2019. "Improving the Reference Standard for the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis: A Challenge for Current and Future Tests." Mem. Inst. Oswaldo Cruz 114: e180452.

Ana Izabel Passarella Teixeira^a, Debora Marcolino Silva^a, Tamires Vital^{a,b}, Nadjar Nitz^b, Bruna Caroline de Carvalho^a, Diana Oliveira^b, Edward Oliveira^c, Ana Rabello^c, Gustavo Adolfo Sierra Romero^a

^a Núcleo de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

^b Laboratório Interdisciplinar de Biociências, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

^c Grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Instituto René-Rachou-FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Endereço para correspondência: gromero@unb.br

Resumo:

Os estudos de validação de testes diagnósticos na leishmaniose visceral canina frequentemente apresentam resultados de heterogêneos na acurácia dos testes. A heterogeneidade decorre em parte da heterogeneidade de padrões de referência utilizados e do tempo de evolução da infecção nos animais, dentre outros fatores. O presente estudo teve por objetivo avaliar a acurácia dos testes TR-DPP (Biomanguinhos®), EIE-LVC (Biomanguinhos®), o ELISA rk39 (*in house*) e o teste DAT-Canis frente a um padrão de referência constituído por uma combinação de técnicas parasitológicas e técnicas moleculares. Realizou-se um estudo de validação de fase II/III em uma amostra de soros de 123 cães, predominantemente assintomáticos, residentes em uma área endêmica de leishmaniose visceral,

armazenados em um biobanco. Dos 123 animais, 69 (56,1%) foram considerados infectados de acordo com o padrão de referência estabelecido. A sensibilidade e a especificidade de cada teste foram, respectivamente: DAT-Canis [18,84% (IC95% 11,35% a 29,61%) e 96,30% (IC95% 87,46% a 98,98%)]; EIE-LVC [11,59% (IC95% 5,99% a 21,25%) e 90,74% (IC95% 80,09% a 95,98%)]; TR-DPP [21,74% (IC95% 13,64% a 32,82%) e 92,59% (IC95% 82,45% a 97,08%)] e ELISA rK 39 [37,68% (IC95% 27,18% a 49,48%) e 83,33% (IC95% 71,26% a 90,98%)]. Todos os testes apresentaram valores de sensibilidade baixos e especificidade elevada. Este comportamento poderia ser atribuído pelo menos em parte à elevada sensibilidade do padrão de referência combinado que conseguiu identificar um maior número de cães assintomáticos e sugere que a falta de especificidade imputada tradicionalmente ao diagnóstico sorológico deve-se em parte à imperfeição do padrão de referência utilizado nos estudos de validação prévios. Conclui-se que a baixa sensibilidade dos testes sorológicos para o diagnóstico de cães assintomáticos deve constituir preocupação prioritária no processo de desenvolvimento de novos testes diagnósticos a serem utilizados no programa de controle de leishmaniose visceral no Brasil.

Palavras-chave: canine visceral leishmaniasis, diagnostic tests, serology.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma metazoonose cujo controle é crucial para reduzir a ocorrência da leishmaniose visceral humana (LVH), pois o cão é o principal reservatório do agente etiológico em meio urbano (Sevá et al. 2016; Rocha et al. 2018).

O programa brasileiro de controle da LVH preconiza a detecção e eutanásia de cães infectados, utilizando, sequencialmente, dois testes sorológicos que apresentam acurácia diagnóstica menor em cães assintomáticos ou em estágios iniciais da infecção (Romero & Boelaert 2010; Schubach et al. 2014; Peixoto et al. 2015; Larson et al. 2016; Lopes et al. 2017). Apesar de alguns trabalhos indicarem que testes sorológicos podem ser usados com eficácia para o diagnóstico de animais assintomáticos (Larson et al. 2016; Paz et al. 2018) destaca-se que o desempenho dos testes sorológicos pode ser até 20% inferior ao desempenho dos testes moleculares nesse subgrupo (Lopes et al. 2017; Carvalho et al. 2018). Os testes de diagnóstico molecular não são utilizados rotineiramente em programas de saúde pública pelas dificuldades relativas à exigência de infraestrutura laboratorial complexa, assim como custo direto elevado e falta de ensaios comercialmente disponíveis, dentre outras limitações (Lopes et al. 2017; Carvalho et al. 2018; Figueiredo et al. 2018, Paz et al. 2018).

O diagnóstico dos animais com LVC sintomática enfrenta menos problemas, pois estes apresentam frequentemente níveis de anticorpos específicos detectáveis por meio dos testes sorológicos comercialmente disponíveis (Lopes et al. 2017; Carvalho et al. 2018; Figueiredo et al. 2018, Paz et al. 2018). Ainda, os animais sintomáticos apresentam carga parasitária maior, permitindo a detecção do parasito no sangue periférico e tecidos por meio dos métodos de diagnóstico molecular (Torrecilha et al. 2016).

O papel dos cães infectados que permanecem assintomáticos no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral entre cães e de cães para humanos ainda não foi plenamente esclarecido. Teoricamente, a menor carga parasitária em cães assintomáticos traduzir-se-ia em menor capacidade infecciosa para os flebotomíneos, no entanto, os animais assintomáticos constituem a maior proporção da população infectada sendo capazes de transmitir o parasito aos vetores (Soares et al. 2011; Laurenti et al. 2013; Borja et al. 2016; Magalhães-Junior et al. 2016).

Considerando que a maioria de cães infectados permanece assintomática, pelo menos durante um período da evolução da infecção, é importante que esses sejam acuradamente detectados, independente da medida de controle a ser aplicada na população canina. Com efeito, trabalhos de modelagem matemática demonstram que a chave para o potencial sucesso em se controlar a LVC pode estar em conseguir identificar os cães assintomáticos (Esteva et al. 2017; Zou et al. 2017).

Nesse sentido, novos testes diagnósticos estão em desenvolvimento, com resultados promissores nas fases iniciais (Oliveira et al. 2016; Faria et al. 2017; Dias et al. 2018; Nogueira et al. 2018) porém, é necessário que sejam desafiados frente a um padrão de referência robusto. O contexto atual se caracteriza pela falta de consenso sobre o melhor padrão de referência para validação de testes diagnósticos para LVC e poucos estudos tem utilizado padrões de referência razoavelmente adequados (Paiva-Cavalcanti et al. 2015; Peixoto et al. 2015).

Dentre os novos testes em desenvolvimento se encontra o *DAT-Canis* baseado no princípio de aglutinação direta que utiliza antígeno bruto de *Leishmania infantum*. O teste foi desenvolvido no Instituto René Rachou (Fiocruz, Minas Gerais) e o protótipo é um kit, que permite realizar até 480 reações com baixo custo (US\$0,44/reação considerando o teste *in house*), com metodologia de execução simples, sem necessidade de infraestrutura laboratorial complexa.

O trabalho teve o objetivo estudar a acurácia dos testes TR-DPP (Biomanguinhos®), EIE-LVC (Biomanguinhos®), atualmente recomendados para o diagnóstico de LVC no Brasil, o teste imunoenzimático com antígeno recombinante rk39 (*in house*) e o teste DAT-Canis em amostras de soro de cães residentes em uma região endêmica do Distrito Federal, Brasil, frente a um padrão de referência constituído por uma combinação de técnicas parasitológicas e técnicas moleculares de PCR convencional e qPCR.

METODOLOGIA

Tipo de estudo

Estudo de validação de testes de fase II/III em amostras de soro coletadas consecutivamente em uma amostra aleatória e não pré-selecionada de cães residentes em uma área endêmica da leishmaniose visceral. (Boelaert et al., 2007).

Considerações éticas

A coleta das amostras biológicas utilizadas no estudo foi aprovada pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob o número UnBDoc 11253/2015.

Os proprietários legalmente competentes aceitaram voluntariamente a participação dos seus animais no estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Amostras

As amostras utilizadas nesse estudo fazem parte de um banco mantido no Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical (NMT/FM/UnB) que foram obtidas no estudo: Risco, diagnóstico e prognóstico da leishmaniose visceral canina no Distrito Federal. As amostras foram coletadas de cães residentes numa área endêmica do Distrito Federal que participaram da avaliação na linha de base de um estudo de coorte que tem por objetivo determinar o papel de fatores socioeconômicos e de cuidados dos proprietários sobre o risco de adquirir LVC. Os cães incluídos no estudo foram selecionados aleatoriamente e a coleta das amostras foi realizada no período de outubro 2015 a maio de 2017.

Os critérios de inclusão dessas amostras no presente trabalho: ter disponível material biológico armazenado suficiente para realização dos testes sorológicos e ter realizado todos os testes que compuseram o padrão de referência.

Avaliação clínica

Os cães, fonte das amostras, foram avaliados clinicamente, sem conhecimento prévio de se estavam infectados ou não e um escore de sinais foi atribuído para cada um, seguindo um modelo adaptado de Proverbio et al., (2014) que consiste nos sinais clínicos listados em uma tabela com uma escala de intensidade. Essa adaptação consistiu em eliminar itens que não poderiam ser determinados com apenas um único exame físico. Os itens excluídos foram: alterações de apetite, alterações de estado mental, intolerância a exercício, processo de emagrecimento, poliúria, polidipsia, proteinúria. Itens esses que em suas maiores intensidades poderiam acrescentar até 20 pontos ao escore.

Como havia mais de um médico veterinário realizando as coletas e os exames físicos, outros itens cuja avaliação poderia ser subjetiva foram alterados, de forma que apenas a presença ou ausência desses sinais fosse relatada. Esses itens foram lesões cutâneas, hepatoesplenomegalia, epistaxe, vômito, diarreia, claudicação, pigmentação alterada, hiperqueratose e onicogribose. Com essa alteração, esses itens deixam de acrescentar, em sua intensidade máxima 21 pontos.

Com essas adaptações – realizadas com um projeto piloto com 20 avaliações com 2 médicos veterinários, o escore clínico sugestivo novo passa ter escore máximo de 46 pontos, ao invés dos 87 do modelo inicial.

Quadro I - Escore de sinais clínicos sugestivos de LVC, conforme adaptação do modelo de Proverbio e colaboradores (2014)

	0	1	2	3
Condição corporal	Obeso/Normal	Magro	Caquexia	
Mucosas	Normais	Hipocoradas	Ictéricas	
Desidratação	Ausente	Leve	Moderada a intensa	
Atrofia muscular em algum membro	Ausente	Leve	Moderada a intensa/disseminada	
Lesões Cutâneas	Ausente	Presente		
Hepatoesplenomegalia	Ausente	Presente		
Conjuntivite e/ou Ceratite	Ausente	Unilateral e leve	Unilateral severa/bilateral	
Uveíte e/ou Blefarite	Ausente	Unilateral e leve	Unilateral severa/bilateral	
Linfoadenomegalia	Ausente	1 a 2 linfonodos		3 ou mais Generalizada
Epistaxe	Ausente	Presente		

Úlceras e/ou Nódulos na boca	Ausente	1 a 2	3 ou mais	
Vômito	Ausente	Presente		Frequente e com vômito
Diarreia	Ausente	Presente		
Claudicação	Ausente	Presente		
Eritrema	Ausente	1 a 25% do corpo	25 a 40% do corpo	40% ou mais do corpo
Dermatite esfoliativa seca	Ausente	1 a 25% do corpo	25 a 40% do corpo	40% ou mais do corpo
Dermatite ulcerativa	Ausente	1 a 25% do corpo	25 a 40% do corpo	40% ou mais do corpo
Dermatite nodular	Ausente	1 a 25% do corpo	25 a 40% do corpo	40% ou mais do corpo
Dermatite pustular	Ausente	1 a 25% do corpo	25 a 40% do corpo	40% ou mais do corpo
Alopecia	Ausente	1 a 25% do corpo	25 a 40% do corpo	40% ou mais do corpo
Pigmentação alterada	Ausente	Presente		
Hiperqueratose das trufas e coxins	Ausente	Presente		
Onicogribose	Ausente	Presente		

Padrão de referência

O padrão de referência foi composto pelos seguintes testes: visualização de amastigotas no esfregaço de medula óssea; isolamento de promastigotas em cultura de medula óssea; amplificação de DNA do parasito utilizando alvo de kDNA, confirmado pela amplificação de DNA do parasito utilizando alvo de ITS1, no sangue periférico e no aspirado de medula óssea; amplificação de DNA do parasito utilizando alvo de kDNA pela técnica de qPCR, no sangue e na medula óssea.

Todos os animais foram submetidos a todos os exames do padrão de referência.

Definição de caso de infecção

O animal foi considerado infectado quando houve resultado positivo em qualquer um dos exames que constituíram o padrão de referência. E, o animal foi considerado não infectado quando houve resultado negativo em todos testes que compuseram o padrão de referência.

Execução dos testes do padrão de referência

Os profissionais que realizaram os testes do padrão de referência não tiveram conhecimento das características do animal fonte das amostras.

As lâminas com os esfregaços de medula óssea foram coradas com Giemsa (Merck®) ou Panótico (Instant Prov, Laboratório NewProv) e foram observadas em microscópio ótico, com objetiva de 100x e óleo de imersão, buscando-se identificar formas amastigotas (Jain, 1986). Para cada cão, foram examinadas pelo menos duas lâminas, por varredura de toda preparação.

A cultura foi realizada com uma gota do aspirado de medula óssea que foi inoculada em meio de cultura NNN (Neal-Novy-Nicolle) preparado de acordo com a metodologia adotada no Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina. (Romero et al, 1999).

Cada amostra foi inoculada em duplicata e os tubos foram avaliados a cada dois dias, em microscópio ótico invertido, em busca de movimentação típica que indicasse a presença de promastigotas de *Leishmania* spp. durante o período de 30 dias (Romero et al, 1999).

Testes moleculares

A reação de PCR convencional com alvo de kDNA (Ampuero et al. 2009) foi escolhida para realizar a triagem das amostras e a reação com alvo de ITS1 (Talmi-Frank et al. 2010) foi para confirmar a presença de DNA de *Leishmania* spp. na amostra. Todas as precauções para evitar contaminação foram aplicadas, incluindo a realização dos procedimentos pré-PCR, PCR e pós-PCR em ambientes separados.

Extração de DNA

Após o transporte em caixas térmicas refrigeradas (4 a 8°C), as amostras de sangue com EDTA foram mantidas em -20°C até o processamento. A extração de DNA foi feita com o kit *Wizard Genomic DNA*

Purification (Promega, Madison, WI, Estados Unidos da América) conforme as indicações do fabricante em uma amostra de 300µL. E, por último, o DNA extraído foi hidratado *overnight*, com 100 µL de solução de hidratação.

Para cada procedimento de extração foi incluído um controle negativo para garantir que não houvesse contaminação no processo.

Amplificação da região conservada de kDNA de *Leishmania*

DNA genômicos extraídos de *Leishmania infantum* (MCER/BR/79/M6445), *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/75/M2904) e *Leishmania braziliensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram usados como controles positivos na reação de amplificação

A reação da cadeia da polimerase para detecção de kDNA foi realizada com iniciadores (*primers*) BW-B: 5' CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC 3' FW: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3' ; BW-CA: 5' GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC 3' (Ampuero et al. 2009) que amplificam 120 pares de bases da região conservada de kDNA identificando espécimes do gênero *Leishmania*. E, como controle negativo foi utilizado o controle negativo da extração de DNA.

A solução mãe foi realizada com volume total de 10µL, com 1µL de DNA, 0,5 u de Taq, 1µL dos iniciadores (BW-B e BW-CA na concentração de 0,6µM e FW 1,2µM), 1 µL de MgCl₂ e 1 µL de buffer 5X.

Essas reações foram feitas em termociclador Techne FTC-PLUS (Bibby Scientific LTD. Reino Unido), com a seguinte programação: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 35 Ciclos (aquecimento 95°C por 30 segundos, anelamento 64°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos), extensão final de 72°C por 5 minutos.

Amplificação do gene ITS1

A reação de ITS foi feita com os primers com ITS-219F (AGC TGG ATC ATT TTC CGA TG) e ITS-219R (ATC GCG ACA CGT TAT GTG AG) e o amplicon é de 265pb (Talmi-frank et al. 2010).

Para esse grupo de reações de PCR foi utilizado como controle positivo DNA extraído de cultura de promastigotas de *Leishmania infantum* (MCER/BR/79/M6445) em crescimento logarítmico (10^6) e como controle negativo foi utilizado água milliQ.

A reação foi realizada em volume total de 25 μ L, sendo que 3 μ L são de DNA; 0,5 μ L de cada um dos iniciadores (40nM); 0,2 μ L de dNTPS (2 mM); de 5,0 μ L tampão 5X; 0,3 μ L de Taq (5U); 0,75 μ L de $MgCl_2$ ($MgCl_2$).

A amplificação foi realizada em termociclador (Techne FTC-PLUS Bibby Scientific LTD., Reino Unido), com a seguinte programação: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 40 Ciclos (aquecimento 95°C por 30 segundos, anelamento 57°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos), extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram mantidos a 4°C até a revelação em gel de poliacrilamida a 7,5% (150 volts, 75Amp por 90 minutos) corado pela prata.

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para detecção de kDNA de *Leishmania spp.* foi realizada com os iniciadores 5'-GGC CCA CTA TATTAC ACC AAC CCC-3' e 5'-GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA-3', conforme descrito por Pita-Pereira et al. (2012).

Cada reação foi realizada com 0,2 μ M de cada iniciador, 2 μ L de DNA (amostras com concentração de 25ng/ μ L), 1X *Power Green Syber Mix* sendo o volume final de 10 μ L por reação.

Em todas as reações foram utilizados dois controles positivo de *Leishmania infantum* (MCER/BR/79/M6445) um na concentração de 5ng/ μ L e outro na concentração de 0,005 ng/ μ L. E com dois controles negativos, um branco, sem DNA e um outro com DNA de cultura de células Hek. Os resultados foram analisados no Design&Analysis Software com uma curva CT padrão considerados positivos até o CT 34 e a sensibilidade da curva padrão 0,005 ng/mL de DNA de *Leishmania infantum*.

O termociclador utilizado foi o Quant Studio 3 Applied da Biosystems. Design&Analysis Software com o ciclo: 95°C de temperatura inicial (atingida em 2 etapas do *Hold Stage*), 40 vezes (desnaturação 94°C por 15

segundos, anelamento 55°C por 40 segundos, extensão 72°C por 8 segundos). Os resultados foram codificados em positivo e negativo.

Testes sorológicos

Os exames sorológicos TR DPP (Biomanguinhos®) e ELISA (EIE-LVC) (Biomanguinhos®) foram realizados em amostras de soro enviadas para a Diretoria de Vigilância Ambiental do Distrito Federal DIVAL, que é o órgão responsável pelo controle e combate de zoonoses no Distrito Federal. Os testes foram realizados seguindo as recomendações do fabricante e de acordo com o preconizado pelo Ministério da Saúde (Brasil 2014).

O ELISA rk39 foi realizado no Instituto de Pesquisa René-Rachou, Fiocruz em Belo Horizonte. As placas Nunc-maxi sorp foram sensibilizadas com tampão de carbonato/bicarbonato com antígeno rk39 na concentração de 1µg/mL (Ag Rk39, Infectious Disease Research Institute, Seattle, WA, USA) em câmara úmida em geladeira (2 a 8°C) *overnight*. Depois foram congeladas à -20°C para o uso. As microplacas foram lavadas três vezes com tampão fosfato contendo Tween 0,05% (TF-Tween) e, 200µL/orifício de leite 5% diluído em (TF-Tween-Leite 5%) foram adicionados em cada orifício da microplaca, incubando-se por 2 horas em câmara úmida a 37°C. Após novas lavagens foram adicionados 50µL de cada amostra de soro diluído 1:100 em TF-Tween-Leite 1% em duplicata, incubando-se por uma hora em câmara úmida a 37°C. Seguida de novas lavagens a microplaca foi incubada em câmara úmida a 37°C com 50µL/orifício de conjugado anti-IgG canino conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído 1:50.000 em TF-Tween-Leite 1%.

As microplacas foram novamente lavadas e incubadas por cinco minutos no escuro com 50µL/orifício de TMB (Tetrametilbenzidina, Sigma Aldrich) e a reação foi bloqueada com 50µL de solução de ácido sulfúrico 1N em cada poço. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Device, San Jose, CA, USA) em comprimento de onda de 450/620nm. O cut-off foi definido pela média das

leituras de absorvância de 13 amostras controle negativas, adicionada de dois desvios padrão. As amostras que apresentaram diferença nas leituras de absorvância acima de 20% foram retestadas.

O kit teste de soroaglutinação DAT-*Canis* é composto por um frasco de antígeno liofilizado, composto por promastigotas coradas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV), um frasco com solução de reidratação e um frasco com solução diluente.

A execução do teste é procedida da seguinte forma. Primeiramente, o antígeno liofilizado foi reidratado com 5 mL de solução de reidratação. Depositou-se 99µL de solução diluente nos orifícios da primeira coluna de microplaca em fundo em V (Greiner BioOne Produtos Médicos Hospitalares, Americana, SP, BR) e 50µL nas demais (2^a a 12^a). Então, 1µL das amostras de soro foram diluídas nos orifícios da primeira coluna, considerando uma diluição de 1:100. Em seguida, as amostras foram diluídas até 1:800. As microplacas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente e foram adicionados 50µL de antígeno, previamente reidratado, em todos os orifícios da microplaca. A microplaca foi submetida à agitação durante 5 min. e incubada durante 18 horas em uma câmara escura. Soros controle positivo e negativo foram paralelamente testados em cada microplaca. A leitura dos resultados foi realizada visualmente a olho nu. O *cut-off* adotado para definição de resultados positivos e negativos foi de 1:400, como anteriormente descrito (Oliveira et al. 2016). E as amostras positivas no teste qualitativo foram retestadas da mesma forma, diluindo-se as mesmas até 1:102.400

Análise estatística

Os resultados dos testes e informações sobre os cães fonte das amostras foram tabulados no Microsoft Excel, tabelas 2x2 foram construídas, com auxílio do programa estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), para cada teste sorológico e calculados os parâmetros de acurácia e seus respectivos intervalos de 95% de confiança. Foi calculada a acurácia com o uso sequencial dos testes diagnósticos em diferentes

combinações. Foram calculados os valores preditivos positivo e negativo e as razões de verossimilhança positiva e negativa. Foi realizada análise de sensibilidade em relação aos valores preditivos para um espectro hipotético de valores de prevalência de infecção.

Também foi realizada uma comparação entre o escore clínico dos cães infectados e não infectados com o *Mann-Whitney U-test*.

Conselho de Ética

A coleta de amostras biológicas foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. Os proprietários dos animais, legalmente competentes, consentiram a participação dos seus animais no estudo e assinaram um termo de consentimento.

RESULTADOS

Os critérios de inclusão dos 123 animais no estudo estão representados no fluxograma da figura 1:

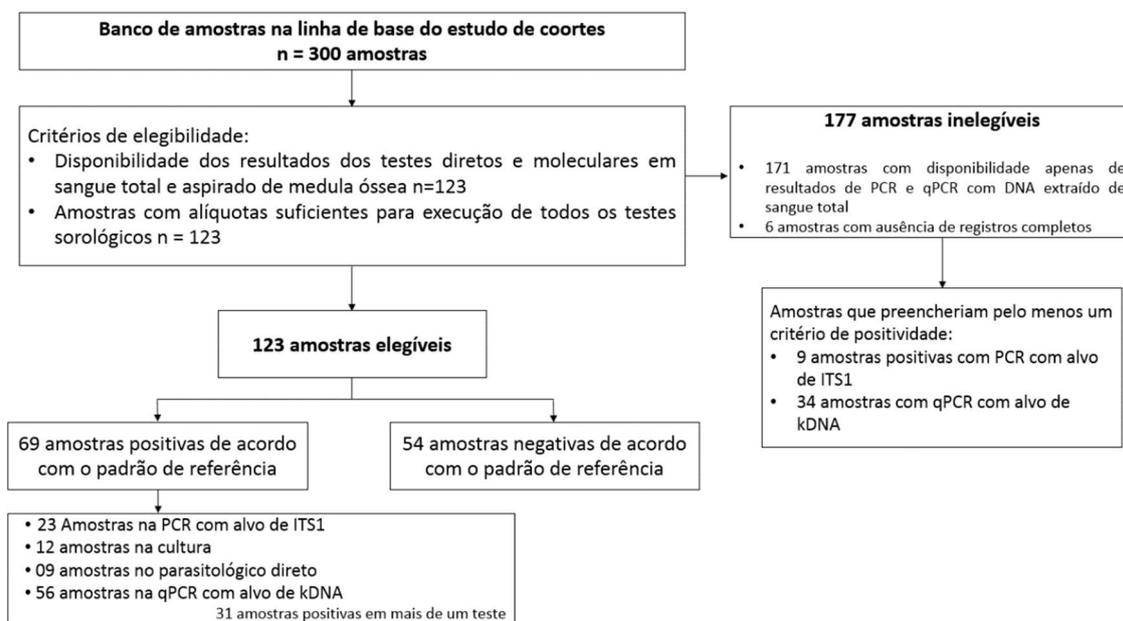


Figura 1 - Fluxograma de seleção de amostras, Brasília, DF, 2017

Características dos cães dos quais foram obtidas as amostras

Do total de 123 animais, 69 (56,1%) foram considerados infectados de acordo com o padrão de referência. Desse total, 36,23% (25/69) foram considerados positivos na triagem com a PCR kDNA e confirmados com a PCR ITS1. Na cultura e parasitológico direto 17,39% (12/69) foram considerados positivos e 81,15% (56/69) foram positivos qPCR kDNA. A concordância bruta entre os testes está descrita na tabela SI.

Os machos foram 62(50,4%) animais e 59 (48,0%) fêmeas e em apenas dois animais não houve registro dessa característica. Quanto a origem, todos os 123 cães eram domiciliados no Distrito Federal, sendo 77(62,6%) procedentes da região administrativa Fercal, 39 (31,7%) de Sobradinho II, 4 (3,3%) do Lago Sul e 3 (2,4%) do Plano Piloto. A idade referida dos cães foi em média de 3,21 anos (DP = 2,91 anos).

A maioria dos animais apresentou poucos ou nenhum sinal. O valor médio do escore de sinais clínicos sugestivos de LVC foi de 2,13 pontos (DP = 3,44 pontos; mediana = 1,0 ponto; quartis 25 e 75 de 0 e 3 pontos). Os cães não infectados completamente assintomáticos (escore zero) foram 22/55 (40%) e os infectados na mesma situação foram 24/66 (36,4%). Dos 55 não infectados, 46 (83,6%) apresentavam escore menor ou igual a 3, enquanto 55 dos 66 infectados (83,3%) apresentavam escore menor ou igual a 3. Figura 2.

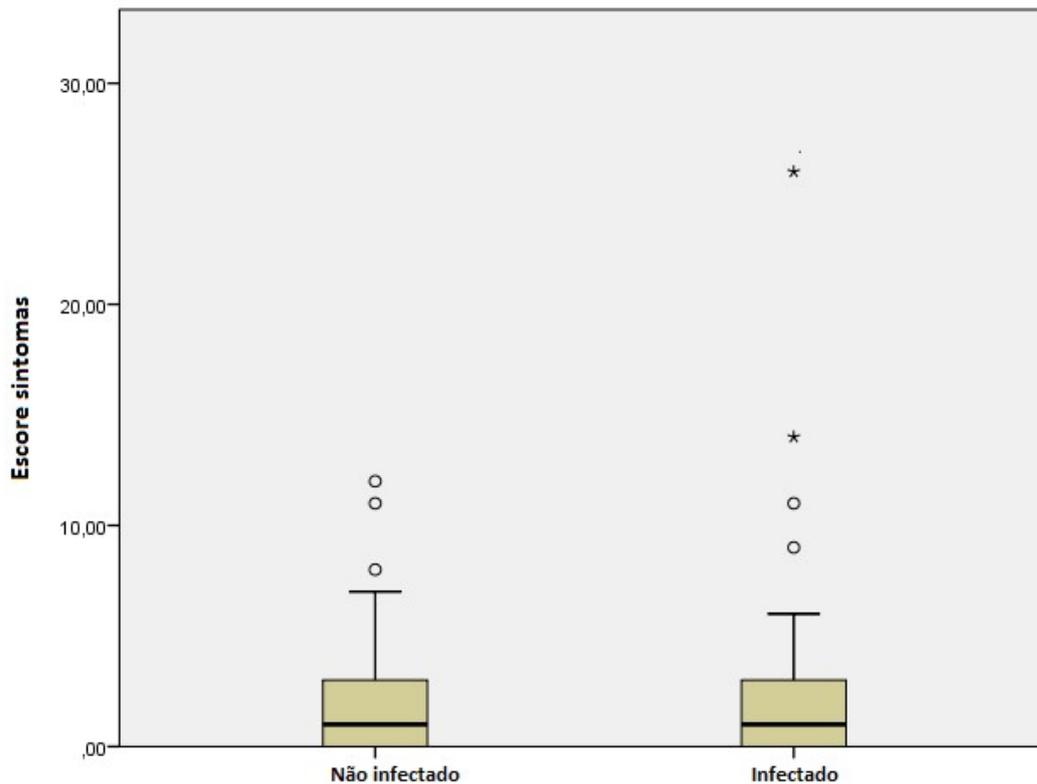


Figura II - Distribuição do escore clínico de LVC nos grupos de animais infectados e não infectados Brasília 2017. 55 cães não infectados, mediana 1 (IQR:0-3; intervalo 0-12 pontos). 66 cães infectados, mediana 1; (IQR:0-3; intervalo 0-26 pontos). (Mann-Whitney U test; $p=0,708$).

Acurácia dos testes sorológicos

A positividade observada nos testes sorológicos foi: 28,5% (35/123) no ELISA rK39; 15,4% (19/123) no TR-DPP; 12,2% (15/123) no DAT-*Canis* e 10,6% (13/123) no EIE-LVC, e a concordância bruta entre os testes sorológicos está na tabela SII.

A tabela I apresenta a frequência dos resultados dos testes sorológicos em relação ao padrão de referência e os seus valores de acurácia.

Tabela I – Acurácia dos testes sorológicos para diagnóstico de leishmaniose visceral canina, Brasília, Distrito Federal, 2017.

		Padrão de Referência		Resultados
		Positivo	Negativo	
DAT- Canis ¹	Positivo	13	2	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidade 18,84 (IC95% 11,35 a 29,61) • Especificidade 96,30 (IC95% 87,46 a 98,98)
	Negativo	56	52	<ul style="list-style-type: none"> • Razão de Verossimilhança Positiva 5,08 (IC95% 1,19 a 21,58) • Razão de Verossimilhança Negativa 0,84 (IC95% 0,74 a 0,95)
EIE - LVC ²	Positivo	8	5	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidade 11,59 (IC95% 5,99 a 21,25). • Especificidade 90,74 (IC95% 80,09 a 95,98).
	Negativo	61	49	<ul style="list-style-type: none"> • Razão de Verossimilhança Positiva 1,25 (IC95% 0,43 a 3,61) • Razão de Verossimilhança Negativa 0,97 (IC95% 0,86 a 1,09)
TR- DPP ³	Positivo	15	4	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidade 21,74 (IC95% 13,64 a 32,82) • Especificidade 92,59 (IC95% 82,45 a 97,08)
	Negativo	54	50	<ul style="list-style-type: none"> • Razão de Verossimilhança positiva de 2,93 (IC95% 1,03 a 8,33) • Razão de Verossimilhança Negativa 0,84 (IC95% 0,73 a 0,97)
ELISA rK39 ⁴	Positivo	26	9	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidade 37,68 (IC95% 27,18 a 49,48) • Especificidade 83,33 (IC95% 71,26 a 90,98)
	Negativo	43	45	<ul style="list-style-type: none"> • Razão de Verossimilhança positiva de 2,26 (IC95% 1,15 a 4,41) • Razão de Verossimilhança Negativa 0,74 (IC95% 0,60 a 0,93)

¹ Direct Agglutination test

² Ensaio Imuno-enzimático

³ Teste rápido de plataforma de duplo percurso

⁴ Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay

Foram avaliados diversos cenários, simulando combinações entre os testes sorológicos, sendo um teste de triagem e outro confirmatório e a especificidade quase sempre atingiu 100%.

O protocolo recomendado pelo Ministério da Saúde, utilizando TR-DPP como triagem, detectaria 19 amostras como positivas e o EIE-LVC confirmaria 7 dessas 19 amostras como positivas. A sensibilidade combinada (7/69) seria de 10,14% (IC95% 5,0 a 19,49) e a especificidade combinada (54/54) seria de 100% (IC95% 93,36 a 100).

A combinação TR-DPP como triagem e DAT-Canis como confirmatório repetiria os resultados do protocolo do MS. Entretanto, se o ELISA rK 39 for o teste confirmatório, das 19 amostras positivas na triagem, 9 seriam confirmadas como positivas. Assim a sensibilidade e especificidade desta última combinação seria, respectivamente, 9/69 ou 13,04% (IC95% 7,02 a 22,97) e 54/54 ou 100% (IC95% 93,36 a 100).

Com o DAT-Canis como teste de triagem, das 15 amostras positivas, 7 seriam confirmadas pelo TR-DPP, sendo a sensibilidade combinada de 7/69 ou 10,14% (IC95% 5,0 a 19,49) e especificidade combinada de 54/54 ou 100% (IC95% 93,36 a 100).

Utilizando o DAT-Canis como triagem e o ELISA rK 39 como confirmatório, das 15 amostras positivas seriam confirmadas 9 amostras e a sensibilidade combinada seria de 9/69 ou 13,04% (IC95% 7,02 a 22,97) e especificidade combinada de 53/54 ou 98,15% (IC95% 93,36 a 100). Para mais informações sobre os valores de acurácia dos testes sorológicos combinados, tabela SIII.

Quando se avalia os valores preditivos positivos e negativos dos testes sorológicos, os valores são semelhantes. No cenário de prevalência desse trabalho, de 56%, os valores de VPP e VPN dos testes foram: DAT-Canis 0,88 e 0,49; TR-DPP 0,79 e 0,49; ELISA rK 39 0,74 e 0,53 e EIE-LVC 0,60 e 0,55. A análise de sensibilidade do VPP e VPN para um cenário hipotético de prevalência de infecção entre 0 e 70% mostrou comportamento similar entre os testes. Figura SI.

DISCUSSÃO

A definição do protocolo de diagnóstico com TR-DPP como teste de triagem e EIE-LVC como confirmatório foi implementada no ano de 2012 (Brasil 2011). Estudos posteriores avaliaram a sensibilidade e especificidade desses testes, isoladamente e em uso sequencial (Grimaldi et al. 2002; Coura Vital et al. 2014; Laurenti et al. 2014; Schubach et al. 2014; Peixoto et al, 2015; Nunes et al. 2015). Porém, a falta de um padrão de referência homogêneo fez com que os resultados entre os diversos estudos fossem discrepantes, pois em cada um adotou-se um tipo diferente de critério para definição do caso de infecção.

Com um padrão de referência, em que os cães foram considerados negativos quando tiveram resultados negativos em outros testes sorológicos para LVC e positivos pelo teste parasitológico direto em aspirado de medula óssea, o TR-DPP demonstrou sensibilidade de 98% em cães sintomáticos (Grimaldi et al. 2002). Em outro estudo com cães assintomáticos e sintomáticos que utilizou o exame imuno-histoquímico em biópsias de pele como referência, a acurácia do TR-DPP alcançou valores de sensibilidade de 82,1% (IC95% 73,7 a 88,4) e especificidade de 98,9% (IC95% 94,4 a 99,8) (Laurenti et al. 2014). Outro estudo que utilizou como padrão de referência composto de testes parasitológicos, incluindo a cultura do parasito, histopatologia convencional com H&E e imuno-histoquímica para avaliar o TR-DPP, demonstrou sensibilidade de 88,0% (IC95% 67,5 a 96,8) e especificidade de 69,2% (IC95% 63,7 a 74,3) (Schubach et al. 2014). O *DAT-Canis* apresentou sensibilidade de 97,1% especificidade de 97% em cães sintomáticos (Oliveira et al. 2016), não tendo seu desempenho sido avaliado anteriormente no diagnóstico de cães assintomáticos.

Peixoto e colaboradores (2015) realizaram metanálise da acurácia de testes para diagnóstico da LVC e estimaram uma sensibilidade de 83,5% (IC95% 78,3 a 87,9) e especificidade de 72,9% (IC95% 70,5 a 75,2) para o TR-DPP e sensibilidade de 89% (IC95% 86,9 a 90,9) e especificidade de 87% (IC95% 85,6 a 88,3) para o teste imunoenzimático ELISA com

antígenos brutos. Nesse estudo foi identificada heterogeneidade no tipo de padrão de referência utilizado nos estudos incluídos na metanálise e foi evidente a escassez de estudos realizados em população canina assintomática.

Um trabalho que utilizou apenas o diagnóstico parasitológico como referência estimou sensibilidade de 46,2% para o TR-DPP e 46,3% para o EIE-LVC (Nunes et al. 2015). Outro estudo mais recente que utilizou o exame parasitológico direto associado à cultura do parasito estimou sensibilidade do TR-DPP de 100% e especificidade que variou entre 22 e 96% (Mendonça et al. 2017). O estudo de Silva et al., (2016) utilizou testes sorológicos como padrão de referência e a sensibilidade do TR-DPP foi de 58,33% (IC95% 43 a 72). O estudo de Carvalho et al., (2018) demonstrou que se utilizando qPCR em amostras de soro sanguíneo, o protocolo de diagnóstico de LVC preconizado pelo Ministério da Saúde teve sensibilidade de 67,24% (IC95% 54,42 a 77,92) e especificidade de 86,59% (IC95% 77,55 a 92,34).

Ainda, é válido salientar que por ter maior sensibilidade e menor custo, alguns pesquisadores (Coura-Vital et al. 2014; Laurenti et al. 2014) recomendam que o EIE-LVC deveria ser o teste de triagem, e o TR-DPP, pela maior especificidade, o teste confirmatório no protocolo de diagnóstico de LVC no Brasil. Recomendações essas condizentes com os resultados do presente estudo, em que a sensibilidade foi maior quando os testes foram analisados nessa sequência.

No contexto de imperfeição e heterogeneidade dos testes utilizados como padrão de referência nos estudos de validação, uma alternativa, que não foi muito explorada, seria o uso de análise de classes latentes para estimar, de forma indireta, a acurácia dos testes como fez Solcà e colaboradores (2014). Nesse trabalho, a análise de classes latentes utilizou uma combinação de resultados sorológicos (TR-DPP), parasitológicos (cultura de aspirado de baço) e moleculares com qPCR em amostras de baço. E seus resultados identificaram que o tecido mais sensível para identificação da presença de amastigotas é o baço, e nesse levantamento os

resultados de sensibilidade do TR-DPP e EIE-LVC foram de 47,1% e 43,8% respectivamente. Estes dados são substancialmente diferentes dos resultados dos estudos de acurácia que utilizaram outras abordagens para a validação.

A dificuldade de se estabelecer um padrão de referência também reside no fato de não haver consenso de como se deve determinar se um cão está infectado. Tradicionalmente, os testes sorológicos foram utilizados como referência para definir o estado de infecção, no entanto, com reconhecida falta de sensibilidade. Mais recentemente, as técnicas moleculares têm permitido detectar a infecção inclusive em animais soronegativos (Borja et al., 2016; Torrecilha et al., 2016). Essa forma mais sensível de detectar a infecção assintomática pode contribuir para entender melhor a dinâmica de transmissão e a falta de efetividade das medidas de controle de LVC atualmente baseadas na aplicação de testes sorológicos. Este ponto é relevante, pois esses cães, ainda que assintomáticos, podem atuar como reservatórios competentes (Soares et al. 2011; Laurenti et al. 2013; Courtney et al. 2014; Borja et al. 2016; Magalhães-Junior et al. 2016; Esteva et al. 2017; Zou et al. 2017).

De forma análoga, o diagnóstico da infecção assintomática em seres humanos também é desafiador pois o tempo entre o desenvolvimento da infecção e a produção de anticorpos em níveis detectáveis não está claro, abrindo espaço para o uso de técnicas moleculares para aprimorar a detecção precoce da infecção (Medeiros et al., 2017; Sakkas et al, 2016).

No contexto em que a ausência de um padrão de referência bem definido interfere nos resultados dos estudos, este é o primeiro a utilizar um padrão de referência composto que inclui tanto as técnicas parasitológicas convencionais quanto uma combinação de testes moleculares em amostras de sangue e medula óssea que são de relativa fácil obtenção.

Com o padrão de referência utilizado, os resultados de acurácia do teste DAT-Canis mostraram comportamento semelhante à acurácia dos outros testes avaliados e que tem sido utilizados na rotina diagnóstica da LVC no programa de controle de LV no Brasil. Apesar do desempenho ter

sido semelhante entre todos os testes avaliados, os resultados dos valores de acurácia foram inferiores do que aos observados em estudos anteriores (Arruda et al. 2013; Peixoto et al. 2015; Oliveira et al. 2016; Leal et al. 2018). A principal diferença entre o presente estudo e os estudos prévios se deve pelo menos em parte ao tipo de padrão de referência utilizado em cada estudo. No presente estudo, a introdução de testes moleculares muito sensíveis aplicados em amostras de sangue e medula óssea certamente contribuiu para conseguir identificar 56,09% das amostras como positivas. Se o padrão de referência fosse composto apenas pelo exame parasitológico direto e a cultura de aspirado de medula óssea, 21 (17,1%) amostras seriam definidas como positivas. Nesse cenário o DAT-Canis teria a sua sensibilidade estimada em 28,57% (IC95% 13,81 a 49,96) e a especificidade em 91,18% (IC95% 84,08 a 95,29). Comportamento semelhante seria observado na acurácia dos outros testes sorológicos que foram desafiados contra o padrão de referência utilizado neste estudo. O problema da baixa sensibilidade das técnicas avaliadas é muito preocupante, pois, o padrão de referência utilizado ainda seria passível de aprimoramento com a inclusão de diagnóstico molecular em tecido cutâneo o que provavelmente comprometeria ainda mais o desempenho dos testes sorológicos que foram avaliados (Reis et al., 2013).

No presente estudo não foi possível estabelecer a influência da sintomatologia na acurácia dos testes porque a grande maioria dos cães era assintomática e porque não houve diferença significativa no escore de sintomas entre os grupos de infectados e não infectados. Essa diferença de capacidade de detecção de LVC em animais sintomáticos e assintomáticos foi explorada em outros estudos com outras técnicas sorológicas. Paltrinieri et al., (2016) cita que o desempenho da sensibilidade da imunofluorescência indireta para detecção de LVC é, em média, de 90% em animais sintomáticos e de 29,4% para assintomáticos. No trabalho de Santarém e colaboradores (2010), utilizando ELISA rK39, a sensibilidade em animais sintomáticos foi de 88% e em assintomáticos de 56%. Em outro trabalho, a acurácia do protocolo do Ministério da Saúde obteve valores de

sensibilidade de 95,24 (IC95% 77,33 a 99,15) e especificidade de 61,11 (IC95% 38,62 a 79,69) em cães sintomáticos e sensibilidade de 51,35 (IC95% 35,89 a 66,55) e especificidade de 93,75 (IC95% 85 a 97,54) em assintomáticos (Carvalho et al. 2018).

Tudo isso reforça a noção que os testes sorológicos enfrentam para identificar cães assintomáticos tendo em vista que o diagnóstico sorológico constitui a principal ferramenta utilizada nos inquéritos para fins de controle de LVC. Dessa forma, pode-se supor que cães que foram triados em inquéritos sorológicos e considerados soronegativos podem ter estado efetivamente infectados e foram mantidos como reservatórios no ambiente por mais tempo sem que nenhuma intervenção fosse realizada. Como afirmado por Lopes et al., (2017), um de cada cinco cães soronegativos poderia estar infectado, reforçando a preocupação que vem sendo externada por diversos autores a respeito da real capacidade de detecção dos testes atualmente utilizados nos programas de controle (Romero & Boelaert 2010; Lopes et al. 2017).

A necessidade de desenvolver novos métodos de diagnóstico para inquéritos populacionais de cães que consigam discriminar tanto os animais infectados assintomáticos quanto os sintomáticos de uma maneira acurada persiste, pois esse é um ponto chave que pode definir o sucesso ou insucesso para o controle da LVC.

Os paradigmas classicamente aplicados na validação dos testes diagnósticos para LVC estão sendo desafiados pelas técnicas moleculares e novos conhecimentos sobre o papel desses testes e os seus possíveis significados, no contexto da evolução natural da infecção ou no prognóstico após intervenções terapêuticas específicas, são necessários para alcançar consenso sobre o padrão de referência para o diagnóstico nos diversos estádios da doença canina. Especial atenção deverá ser prestada para o valor do resultado dos testes moleculares como marcadores de infectividade dos cães para os vetores artrópodes, pois até o momento, tampouco há marcadores de fácil aferição para a mensuração desse fenômeno. Essa revolução molecular também tem afetado os paradigmas de diagnóstico da

leishmaniose visceral humana. Com protocolos mais sensíveis que são capazes de diagnosticar pacientes em diferentes estágios de infecção em diversos tipos de amostras clínicas, inclusive em pacientes imunossuprimidos que não apresentam níveis detectáveis de anticorpos pelos testes sorológicos tradicionais (Hailu et al. 2016; Sundar & Rai 2018).

As implicações dos nossos resultados e aplicação de medidas de controles mais extremas como a remoção de cães soropositivos devem ser confrontadas e mais estudadas. Pois, parece claro que, no futuro próximo, essa medida extrema será abandonada por sua baixa aceitação pelas comunidades afetadas, bem como pelos aspectos éticos ligados aos cuidados com os animais. Além disso novas medidas de controle têm sido avaliadas, como coleiras impregnadas com inseticidas e vacinas preventivas ou terapêuticas. Para as intervenções que mantem os cães infectados na comunidade, o monitoramento cuidadoso das taxas de infecção será crucial para avaliação da eficácia e nossos dados mostram que os testes sorológicos atuais falharão na detecção da maioria dos animais infectados sem sinais clínicos de leishmaniose visceral. Finalmente, a infeciosidade de cães assintomáticos com resultados positivos exclusivamente através de ensaios de detecção de DNA de parasitas merece atenção especial, mas, até prova em contrário, parece razoável considerar esses cães como fonte potencial de infecção.

Apesar da área em que foi realizada a coleta dos cães ter produzido um pequeno número de casos humanos, eles têm sido consistentes e a área têm sido alvo de intervenções tradicionalmente recomendadas pelo programa de controle da leishmaniose visceral (Carranza-Tomayo et al. 2017). E considerando a rápida dispersão territorial, traz necessidade de testes mais sensíveis para se detectar mais precocemente essa dispersão. Os testes sorológicos disponíveis atualmente aparentam ser inadequados para esse fim e melhorar a sensibilidade pode ser crucial para esse cenário.

Com os resultados do presente estudo, conclui-se que a baixa sensibilidade dos testes sorológicos para o diagnóstico de cães assintomáticos deve constituir preocupação prioritária para os pesquisadores

e para os gestores da política de controle de leishmaniose visceral no Brasil. Parece oportuno sugerir que a preocupação sobre a falta de especificidade dos testes para diagnóstico de LVC talvez não seja tão relevante quanto a baixa sensibilidade, pois os resultados aqui demonstrados apontam que os problemas de falta de especificidade relatados em outros estudos poderiam ter sido determinados pelo erro de classificação causado por padrões de referência imperfeitos que apresentam baixa sensibilidade.

Agradecimentos

O estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal -FAPDF- processo 193.000.867/2015 e CNPq processo 142247/2015-4. Ao Médico Veterinário Laurício Monteiro Cruz, ao Biólogo Antonio Fonseca da Cunha Neto e à equipe da Diretoria de Vigilância Ambiental do Distrito Federal pela execução dos testes TR-DPP e ELISA. A Ana Paula Sampaio Cardoso e Ana Cláudia Negret Scalia pela execução das PCRs e grande ajuda operacional no laboratório. O antígeno recombinante k 39 utilizado no ELISA rK 39 foi generosamente doado por Reed S.G. do Infectious Disease Research Institute, Seattle, WA, USA.

REFERÊNCIAS

Ampuero J, Rios AP, Carranza-Tamayo CO, Romero GAS. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localised cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(7):992-7

Boelaert M, Bhattacharya S, Chappuis F, El Safi S, Mondal D, Rijal S. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. *Nature Reviews Microbiology* 2007; 5, pages S30–S39. doi: 10.1038/nrmicro1766

Borja LS, Sousa OMF, Solcà MS, Bastos LA, Bordoni M, Magalhães JT. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Vet Parasitol*. 2016; 229:110–117

Brasil, MS/SVS/DVE - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. 120 pp.

Brasil, MS/SVS/DVIT - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Nota Técnica Conjunta 01/2011. Brasília: CGDT/CGLAB/DVIT/ SVS/MS; 2011

Carranza-Tamayo CO, Werneck GL, Romero GAS, Are opossums a relevant factor associated with asymptomatic *Leishmania* infection in the outskirts of the largest Brazilian cities? *Braz J Infect Dis* 2016; 20(2): 119-126

Carvalho FLN, Riboldi EDO, Bello GL, Ramos RR, Barcellos RB, Gehlen M. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: A comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. *Epidemiol Infect.* 2018; 146(5):571–6

Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Leal GGDA, Moreira NDD. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *PLoS One.* 2014; 9(3):1–6

Courtenay O, Carson C, Calvo-Bado L, Garcez R, Quinnell JR. Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: Using Skin Parasite Burdens to Identify Highly Infectious Dogs. *PLoS Neg. Trop. Dis.* 2014; 8 (1): e2583

Dias DS, Ribeiro PAF, Salles BCS, Santos TTO, Ramos FF, Lage DP. Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. *Parasitol Int.* 2018; 67(3):344–50

Esteva L, Vargas C, Vargas de León C. The role of asymptomatics and dogs on leishmaniasis propagation. *Math Biosci.* 2017; 293:46-55. doi: 10.1016/j.mbs.2017.08.006

Faria AR, Pires SF, Reis AB, Coura-Vital W, Silveira JAG, Sousa GM. Canine visceral leishmaniasis follow-up: a new anti-IgG serological test more sensitive than ITS-1 conventional PCR. *Vet Parasitol.* 2017; 248:62–7

Figueiredo FB, Vasconcellos TCB, Madeira MF, Menezes RC, Maia-Elkhoury ANS, Marcelino AP, *et al.* Validation of dual-path platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL Rapid Test) for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018; 113(11): e180260

Grimaldi G, Teva A, Ferreira AL, Santos CB, Pinto IS, Azevedo CT. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP®CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106(1):54–9

Hailu T, Yimer M, Mulu W, Abera B. Challenges in visceral leishmaniasis control and elimination in the developing countries: a review. *J Vector Borne Dis.* 2016; 53(10):193–8

Jain, N.C., Schalm's Veterinary Hematology, 4th Ed. Lea & Febiger, 1986. Philadelphia.

Laurenti MD, Rossi CN, Matta VLR DA, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol.* 2013; 196(3–4):296–300.

Laurenti MD, Santana LMV, Tomokane TY, Lucca HRL, Aschar M, Souza CSF. Comparative evaluation of the DPP CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2014; 205(3–4):444–50

Larson M, Toepp A, Scott B, Kurtz M, Fowler H. Semi-quantitative measurement of asymptomatic *L. infantum* infection and symptomatic visceral leishmaniasis in dogs using dual-path platform CVL. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016; 101(1):381-390. doi: 10.1007/s00253-016-7925-6

Leal GGA, Carneiro M, Pinheiro AC, Marques LA, Ker HG, Reis AB. Risk profile for *Leishmania* infection in dogs coming from an area of visceral leishmaniasis reemergence. *Prev Vet Med;* 2018; 150:1–7

Lopes EG, Seva AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. *Epidemiol Infec* 2017; 145(12):2436-2444.

Magalhes-Junior JT, Mota TF, Porfirio-Passos G, Larangeira DF, Franke CR, Barrouin-Melo SM. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. *Vet Parasitol* 2016; 223:120–6

Medeiros FAC, Gomes LI, Oliveira E, Souza CSA, Mourao MV, Cota GF. Development and validation of a PCR-ELISA for the diagnosis of symptomatic and asymptomatic infection by *Leishmania (leishmania) infantum*. *J Trop Med.* 2017; ID 7364854.

Mendonça IL, Batista JF, Schallig H, Cruz MSP, Alonso DP, Ribolla PEM. The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2017; 59(e39):1–10

Nogueira CT, Cistia MLDEL, Urbaczek AC, Jusi MM, Velásquez AMA, Machado RZ. Potential application of rLc36 protein for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018; 113(3):197–201

Nunes CM, Lima VMF, Paula HBDE, Perri SHV, Andrade AM, Dias FEF, et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol*. 2008;153(1–2):19–23

Oliveira E, Saliba JW, Oliveira D, Santos DE, PAZ GF. A prototype of the direct agglutination test kit (DAT-Canis) for the serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2016; 221:9–13

Paiva-Cavalcanti M, Morais RCS, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, Gonçalves-de-Albuquerque SC, Tavares DHC. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci*. 2015; 5(1):31

Paltrinieri S, Gradoni L, Roura X, Zatelli A, Zini E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Vet Clin Pathol*. 2016; 45(4):552-578.

Paz GF, Rugani JMN, Marcelino AP, Gontijo CMF. Implications of the use of serological and molecular methods to detect infection by *Leishmania spp.* in urban pet dogs. *Acta Trop*. 2018; 182:198-201.

Proverbio D, Spada E, Giorgi GB, Perego R, Valena E. Relationship between *Leishmania* IFAT titer and clinicopathological manifestations (clinical score) in dogs. *Biomed Res Int*. 2014; 412808.

Peixoto HM, Oliveira MRF, Romero GAS. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis *Trop Med & Int Health*. 2015; 20(3):334–52

Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BAS, Moreira OC, et al. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 2012;5(15): 1-9

Reis LE, Coura-Vital W, Roatt BM, Bouillet LÉ, Ker HG, Brito RCF, Resende DM, Carneiro M, Giunchetti RC, Marques MJ, Carneiro CM, Reis AB. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Vet Parasitol*. 2013;197(3-4):498-503.

Rocha MAN, Matos-Rocha TJ, Ribeiro CM, Abreu SR. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in State of Alagoas, Northeast, Brazil. *Braz J Biol*. 2018; 78(4):609-614.

Romero GAS, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 19;4(1):e584

Romero GAS, Sampaio RNR, MACÊDO VO, Marsden PD. Sensitivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94(4):505–8

Sakkas H, Garzonika C, Levidiotou S. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis*. 2016; 53(1):8-16

Santarém N, Silvestre R, Cardoso L, Schallig H, Reed SG, Cordeiro-da-Silva A. Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(5):1866–74

Schubach EYP, Figueiredo FB, Romero GAS. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014; 108:568–74

Sevá AP, Ovallos FG, Amaku M, Carrillo E, Moreno J, Galati EAB. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLoS One*. 2016; 11(7):e0160058

Silva RBS, Mendes RS, Santana VL, Souza HC, Ramos CPS, Souza AP. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico *Pesq Vet Bras*. 2016; 36(7):625–9

Soares MRA, Mendonça IL, Bonfim JM, Rodrigues JA, Werneck GL, Costa CHN. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Trop*. 2011;117(1):6–9

Solano-Gallego L, Miró G, KoutinaS A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vect*. 2011; 4(1):86-89

Solcà MS, Bastos LA, Guedes CES, Bordoni M, Borja LS, Lorangeira DF. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. *PLoS One* 2014; 9(7):e103635

Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mol Diagn Ther*. 2018; 22: 443.

Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schoönian G, Töz SO, Jaffe CL, Baneth G. Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt analysis. *Plos Negl*. 2010; 4(1):e851. doi: 10.1371/journal.pntd.0000581

Torrecilha RBP, Utsunomiya YT, Bosco AM, Almeida BF, Pereira PP, Narciso LG. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. *Prev Vet Med.* 2016; 132:83–7

Zou L, Chen J, Ruan S. Modeling and analyzing the transmission dynamics of visceral leishmaniasis. *Math Biosci Eng.* 2017; 14(5):1585–604

ARQUIVOS SUPLEMENTARES

Tabela SI. Concordância bruta entre os resultados dos testes que compuseram o padrão de referência

	Parasitológico direto	Cultura	Deteção de kDNA e ITS1 em sangue periférico	Detecção de kDNA e ITS1 na medula óssea	qPCR - kDNA em sangue periférico ou medula óssea
Parasitológico direto	11	2	1	4	6
Cultura		12	1	7	9
Deteção de kDNA e ITS1 em sangue periférico			7	2	4
Detecção de kDNA e ITS1 na medula óssea				18	14
qPCR -kDNA em sangue periférico ou medula óssea					56

Tabela SII. Concordância bruta entre os testes sorológicos avaliados.

	TR-DPP	EIE-LVC	ELISA-rk 39	DAT-Canis
TR-DPP ¹	19	7	11	7
EIE-LVC ²		13	8	5
ELISA-rk 39 ³			35	10
DAT-Canis ⁴				15

¹ Teste rápido de plataforma de duplo percurso

² Ensaio Imuno-Enzimático para LVC

³ Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay rk 39

⁴ Direct Aglutination test

Tabela SIII - Acurácia dos testes sorológicos em testagem sequencial para diagnóstico de leishmaniose visceral canina, Brasília, Distrito Federal, 2017.

		Padrão de Referência		Resultados
		Positivo	Negativo	
TR-DPP¹ como triagem e EIE-LVC² confirmatório	Positivo	7	0	<ul style="list-style-type: none"> Sensibilidade 10,14% (IC95% 5,0 a 19,49) Especificidade 100% (IC95% 93,36 a 100) Razão de Verossimilhança Positiva α + Razão de Verossimilhança Negativa 0,89 (IC95% 0,83 a 0,973)
	Negativo	62	54	
TR-DPP¹ como triagem e ELISA rk39³ confirmatório	Positivo	9	0	<ul style="list-style-type: none"> Sensibilidade 13,04% (IC95% 7,02 a 22,97) Especificidade 100% (IC95% 93,36 a 100) Razão de Verossimilhança Positiva α + Razão de Verossimilhança Negativa 0,87 (IC95% 0,79 a 0,95)
	Negativo	60	54	
TR-DPP¹ como triagem e DAT-Canis⁴ como confirmatório	Positivo	7	0	<ul style="list-style-type: none"> Sensibilidade 10,14% (IC95% 5,0 a 19,49) Especificidade 100% (IC95% 93,36 a 100) Razão de Verossimilhança Positiva α + Razão de Verossimilhança Negativa 0,89 (IC95% 0,83 a 0,97)
	Negativo	62	54	
ELISA rk39³ como triagem e DAT-Canis⁴ como confirmatório	Positivo	9	1	<ul style="list-style-type: none"> Sensibilidade 13,04% (IC95% 7,02 a 22,97) Especificidade 98,15% (IC95% 93,36 a 100) Razão de Verossimilhança Positiva 7,04 (IC95% 0,92 a 53,90) Razão de Verossimilhança
	Negativo	60	53	

				Negativa 0,88 (IC95% 0,80 a 0,97)
ELISA rk 39³ como triagem e TR-DPP¹ como confirmatório	Positivo	11	0	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidade 15,94% (IC95% 9,14 a 26,33) • Especificidade 100%(IC95% 93,36 a 100) • Razão de Verossimilhança Positiva $\alpha +$ • Razão de Verossimilhança Negativa 0,84 (IC95% 0,75 a 0,93)
	Negativo	58	54	
EIE-LVC² como triagem e TR-DPP¹ como confirmatório	Positivo	8	0	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidade 11,59% (IC95% 5,99 a 21,25) • Especificidade 100%(IC95% 93,36 a 100) • Razão de Verossimilhança Positiva $\alpha +$ • Razão de Verossimilhança Negativa 0,88 (IC95% 0,81 a 0,96)
	Negativo	61	54	
DAT-Canis⁴ como triagem e TR-DPP¹ como confirmatório	Positivo	7	0	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidade 10,14% (IC95% 5,0 a 19,49) • Especificidade 100% (IC95% 93,36 a 100) • Razão de Verossimilhança Positiva $\alpha +$ • Razão de Verossimilhança Negativa 0,89 (IC95% 0,83 a 0,973)
	Negativo	62	54	
DAT-Canis⁴ como triagem e ELISA rk 39³ como confirmatório	Positivo	9	1	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidade 13,04% (IC95% 7,02 a 22,97) • Especificidade 98,15% (IC95% 93,36 a 100) • Razão de Verossimilhança Positiva 7,04 (IC95% 0,92 a 53,90) • Razão de Verossimilhança Negativa 0,88 (IC95% 0,80 a 0,97)
	Negativo	60	53	

¹ Teste rápido de plataforma de duplo percurso

² Ensaio Imuno-Enzimático para LVC

³ Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay rk 39

⁴ Direct Aglutination test

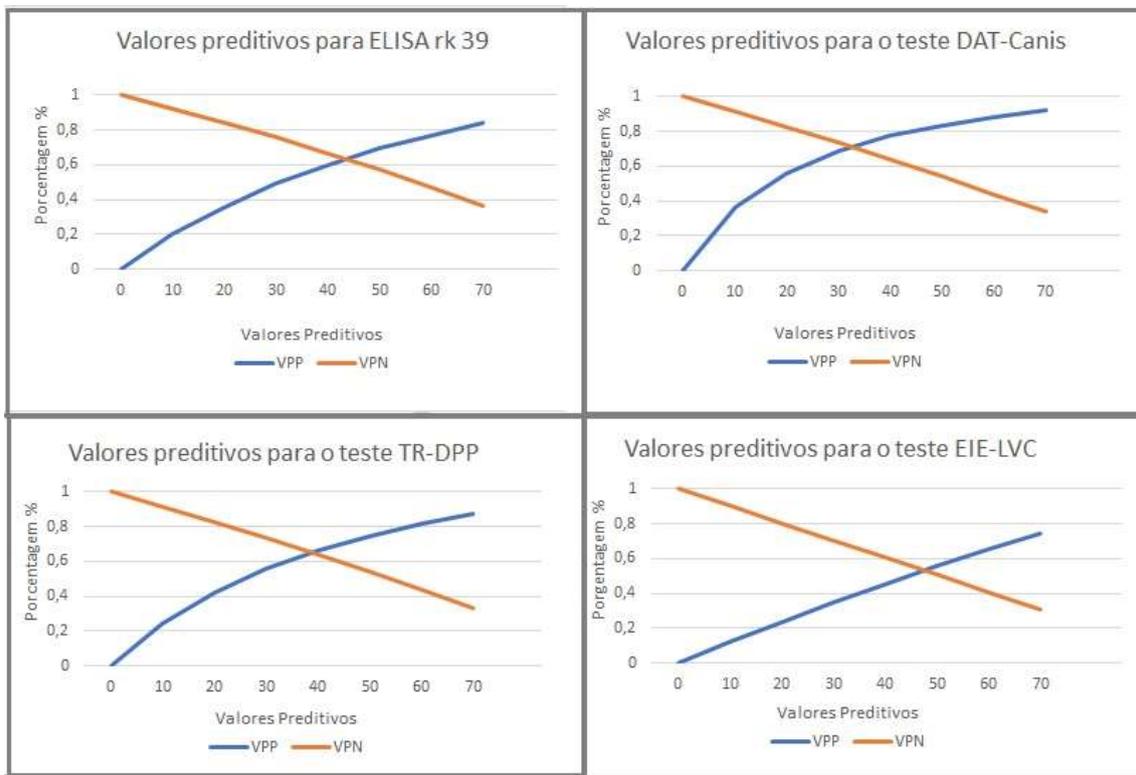


Figura SI. Valores preditivos positivos e negativos dos testes sorológicos avaliados para prevalências hipotéticas de infecção canina variando de 0 a 70%

5.2 Artigo 2: O risco da leishmaniose visceral canina no Brasil: um estudo transversal avaliando características dos proprietários dos animais enquanto preditores de infecção

Ana Izabel Passarella Teixeira^a, Debora Marcolino Silva^a, Lúcia Rolim Santana de Freitas^b, Gustavo Adolfo Sierra Romero^a

^a Núcleo de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

^b Secretaria de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal, Brasil

RESUMO:

A leishmaniose visceral canina é uma enfermidade que, apesar dos esforços de controle, continua a ser um problema de saúde pública. O estudo de fatores associados à infecção canina pode contribuir para a elaboração de melhores estratégias de controle. Foi realizado um estudo transversal em amostra representativa da população canina de uma região endêmica do Distrito Federal para estimar a prevalência de infecção e dos fatores associados à infecção no período de outubro de 2015 a março de 2017. A infecção foi detectada por meio da aplicação combinada de métodos parasitológicos convencionais, sorológicos e moleculares. Os fatores associados foram analisados por meio de uma regressão de Poisson, com o estabelecimento de hierarquias entre os fatores de exposição. A prevalência da infecção foi de 26,25% (IC95%: 20,05 a 33,57) e 13,75% (IC95%: 9,26 a 19,94) dos cães apresentaram infecção sintomática. A prevalência de cães soropositivos, de acordo com a metodologia recomendada pelo Ministério da Saúde foi 9,38% (IC95% 5,76-14,89). Os fatores que apresentaram associação foram: pelagem curta RP de 2,331 (IC95% 1,023 a 5,216); presença de quintal com predominância de terras e/vegetação [RP: 4,153 (IC95% 1,351 a 12,766)]; e o maior escore de poder aquisitivo [RP: 2,027 (IC95% 1,156 a 3,544)]. Esse é o primeiro estudo que relaciona a melhor condição socioeconômica de proprietários de cães com maior prevalência de infecção por leishmaniose visceral. Esta associação deverá ser explorada em profundidade para identificar se fatores, tais como melhor alimentação, vacinação contra doenças letais e outros cuidados oferecidos aos animais de proprietários de maior renda estariam influenciando na taxa de sobrevivência desses animais o que permitiria que fossem expostos por maior tempo ao risco de infecção, permanecendo assintomáticos por longo tempo. Os hábitos de recusa à realização e eutanásia dos animais também podem estar associados à maior prevalência de infecção nesse grupo e certamente precisam ser documentados em estudos futuros. Finalmente, a

combinação de exames sorológicos atualmente recomendados para a detecção da infecção canina demonstrou-se pouco sensível e aponta para a urgente necessidade de revisão dessa abordagem em termos de saúde pública.

Palavras-chave: canine visceral leishmaniasis, diagnostic tests

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença zoonótica, associada, no continente americano, à infecção por *Leishmania infantum*, parasito transmitido pela picada de fêmeas de flebotomíneos, principalmente *Lutzomyia longipalpis* (Lainson 2010). A leishmaniose visceral humana (LVH) constitui um problema de relevância para a saúde pública mundial (Alvar et al. 2012). No Brasil, a carga da doença foi recentemente estimada em 20.9 DALYs (IC: 95%, 11.3 a 34.8 - Bezerra et al. 2018), e os custos relativos ao tratamento dos pacientes afetados por LV foram de aproximadamente 15 milhões de dólares no ano de 2014 (Carvalho et al. 2017).

O cão é considerado o principal reservatório em meio urbano, o que representa um grande desafio para a implementação de medidas de controle, as quais têm se resumido à eutanásia dos animais soropositivos, na tentativa de reduzir o risco de transmissão para os humanos (Rocha et al. 2018). No entanto, é crescente a rejeição à eutanásia, em razão da imensa tendência de valorização dos animais de estimação, em especial do cão (Brasil. 2014; Akhoundi et al. 2016). Além disso, os estudos têm constantemente demonstrado a sua ineficácia (Werneck et al. 2014; Machado et al 2016; Silva et al. 2017).

Em razão dessas dificuldades, novas medidas preventivas e terapêuticas têm sido desenvolvidas e aplicadas nos últimos anos, tais como o uso de produtos contra ectoparasitas, repelentes e até mesmo o tratamento da

doença nos animais. Essas medidas, apesar de, direta ou indiretamente, reduzirem o risco de adquirir a infecção, ou melhorarem o prognóstico quanto ao desenvolvimento de LVC sintomática, precisam de mais estudos para se conhecer os possíveis impactos sobre a saúde humana (Brasil 2016; Campos et al. 2017; Coura-Vital et al. 2018).

Por essas razões torna-se relevante o estudo dos fatores que podem estar envolvidos no processo de adoecimento, aprimorando a sua compreensão, o que poderá contribuir para traçar melhores estratégias de controle da doença.

Com efeito, muito tem sido estudado no que diz respeito aos fatores, ou exposições, associados ao risco do desenvolvimento da LVC na esfera especificamente biológica dos cães. A pelagem curta, por exemplo, sobressai na literatura como o fator mais relevante (Coura-Vital et al. 2013; Belo et al. 2013; Leal et al. 2018). No entanto, outras exposições que transcendem essa esfera especificamente biológica do organismo do animal ainda constituem um campo pouco explorado.

Dentre essas exposições podemos citar as seguintes: (i) o conhecimento dos proprietários sobre a leishmaniose, tanto em humanos quanto em cães, bem como a conscientização sobre a importância da leishmaniose visceral (Costa et al. 2014; Castro et al., 2016); (ii) a presença de condições sanitárias adequadas, como esgoto, água tratada e recolhimento de lixo (Coura-Vital et al., 2013; Ursine et al., 2016); (iii) a presença de matéria orgânica, seja no quintal ou em alguma proximidade (Constantino et al., 2014) e (iv) a existência de rodovias e movimentação de pessoas e animais (Sevá et al., 2017).

Todos esses estudos, é preciso salientar, têm tido em comum a demonstração de que a ação humana sobre o ambiente tem íntima relação com o desenvolvimento da enfermidade.

O presente trabalho avaliou a prevalência da LVC em uma região endêmica do Distrito Federal, e explorou a associação de diversos fatores de risco para a infecção, tanto aqueles já tradicionalmente considerados, quanto outros, bem menos estudados, que estão relacionados à condição socioeconômica da família dos proprietários dos cães, e aos cuidados dispensados aos animais.

METODOLOGIA

Tipo de estudo

Estudo transversal descritivo e analítico

Período do estudo

O período de coleta e processamento das amostras biológicas coletadas dos cães foi de outubro de 2015 a março de 2017

Local do Estudo

A coleta dos dados foi realizada na XXXI região administrativa do Distrito Federal, denominada Fercal. Essa localidade é endêmica em casos humanos e caninos autóctones de leishmaniose visceral (Carranza-Tamayo et al. 2010; Brasil 2013; Carranza-Tamayo et al., 2016). Figura 1.

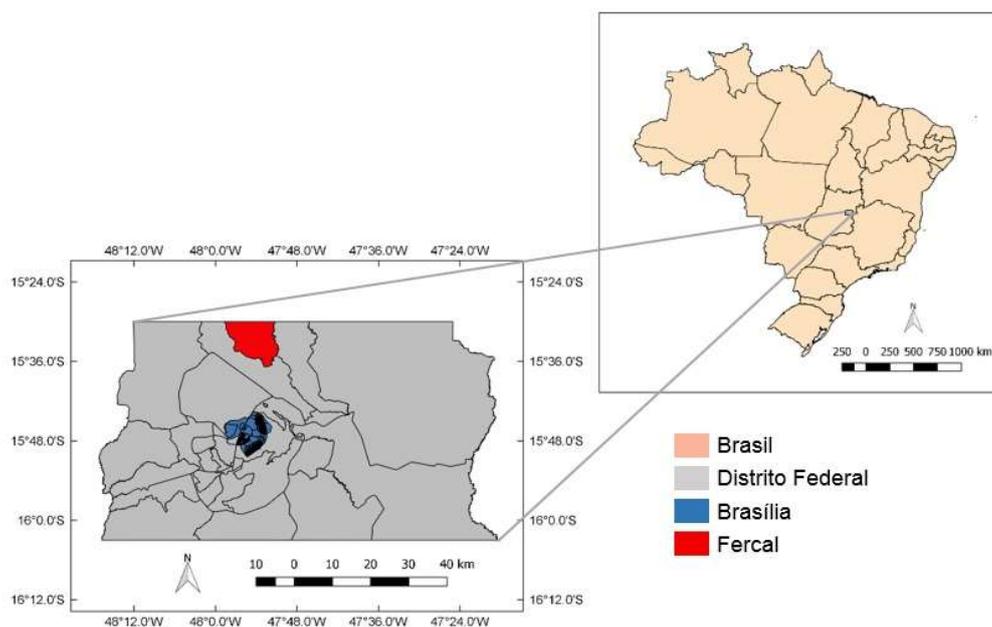


Figura I – Localização geográfica da região administrativa da Fercal no Distrito Federal, Brasil.

Critérios de elegibilidade

A abordagem era por residência, apesar de a unidade da análise ser o cão. Portanto a casa era elegível quando todos esses critérios eram preenchidos: cães maiores de quatro meses de idade e proprietários maiores de idade dispostos a ler e assinar o Termo de Livre Consentimento.

Foram excluídos quando haviam animais com comportamento ou com problemas de saúde que impossibilitassem a realização dos procedimentos diagnósticos sob sedação leve, tais como cardiopatia grave, convulsões e agressividade extrema.

Tamanho amostral

Com base na população humana de 8746 habitantes, estimada na pesquisa amostral por domicílio realizada no ano de 2013, foi estimada uma população canina de 342 animais, de acordo com o recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Bogel et al. 1990; Brasil 2013).

Com base em trabalhos anteriores, em que o percentual de positividade para LVC na Fercal oscilou entre 7 a 14% (Brasil 2013; Silva et al. 2017), e em orientações obtidas diretamente na Diretoria de Vigilância Ambiental do Distrito Federal (DIVAL-DF), a frequência esperada de infecção foi estimada em 10%.

Considerando a margem de erro de 5%, o intervalo de confiança de 95%, e que poderia haver efeito de conglomerado pelo fato de uma residência poder ter mais de um cão, uma correção no efeito de desenho de 1,5 foi introduzida no cálculo (Raggio & Magnanini, 2000). Ainda foram estimadas perdas de 10%, o que resultou em um tamanho amostral de 160 animais. O cálculo da amostragem foi realizado no programa *Stat Calc* do Epi Info, versão 7.2.0.1.

Amostragem

A coleta dos dados foi realizada de forma sistemática: a abordagem teve início a partir da residência da Fercal mais próxima ao Plano Piloto do Distrito Federal e obedeceu ao critério de coletar dados em apenas uma casa de cada quarteirão. Nos casos em que a residência abordada não fosse elegível, a equipe se dirigia à próxima casa, e assim por diante, até que fosse encontrada uma elegível; após os procedimentos, a equipe dirigia-se ao próximo quarteirão em busca de uma nova residência elegível. Houve quarteirões em que não foram encontrados animais ou a presença de seus proprietários, ou ainda em que não houve a aceitação de participação, de tal forma que nesses quarteirões não houve coleta de dados. De qualquer modo, todos os quarteirões foram percorridos pela equipe de coleta, de maneira que todo o território da Fercal foi representado na amostragem. A figura a seguir ilustra como foi realizado esse procedimento:

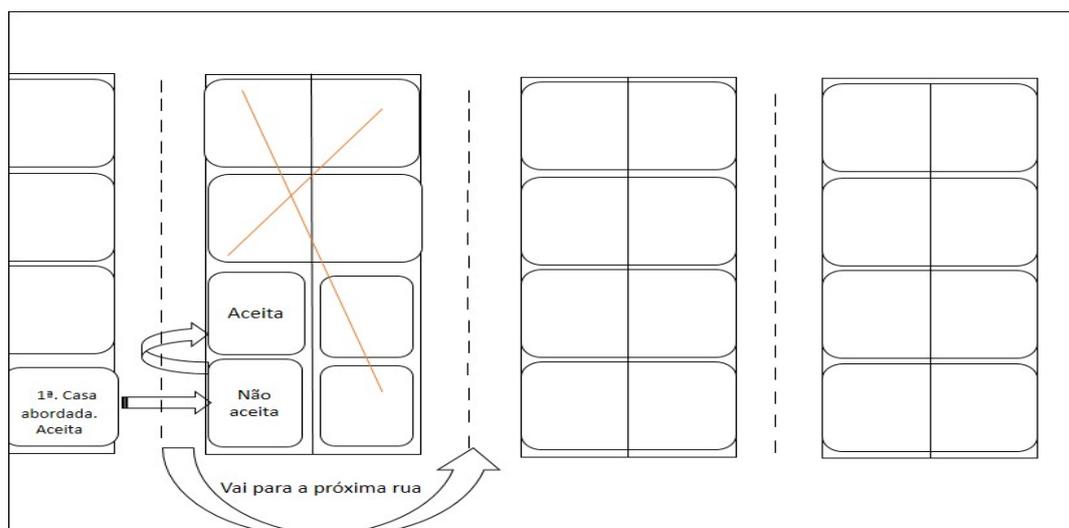


Figura II – Representação de como foi realizada a coleta sistemática

Coleta de dados

Após conferir o cumprimento dos critérios de elegibilidade, a equipe apresentava o projeto aos proprietários dos animais, que, após serem informados de que os resultados positivos para leishmaniose seriam informados à DIVAL-DF para a implementação das medidas de controle adequadas, procediam à leitura e assinatura do termo de consentimento.

Eles também preenchiam um questionário com informações sobre aspectos da sua residência, sobre os cuidados prestados aos cães e uma série de perguntas era realizada para estimar sua classificação socioeconômica, de acordo com o preconizado pela Associação de Empresas de Pesquisa (ABEP 2012), conforme quadro abaixo:

Quadro I - Relação entre a classe econômica e a renda média bruta familiar

Classe	Pontos	Relação com a renda média bruta familiar em reais
A1	42-46	11.037
A2	35-41	6.006
B1	29-34	3.118
B2	23-28	1.865
C1	18-22	1.277
C2	14-17	895
D	8-13	895
E	0-7	895

Fonte: Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa (2012)

As informações relativas as características dos cães foram anotadas em formulário que continha os dados físicos e de avaliação clínica. Os cães foram categorizados em assintomáticos ou sintomáticos, de acordo como as *LeishvetGuidelines* (Solano-Gallego et al. 2011). Isso foi realizado sem conhecimento prévio de se estavam infectados ou não e um escore de sinais foi atribuído para cada um, seguindo um modelo adaptado de Proverbio et al., (2014). Essa adaptação consistiu em eliminar itens que não poderiam ser determinados com apenas um único exame físico. Os itens excluídos foram: alterações de apetite, alterações de estado mental, intolerância a exercício, processo de emagrecimento, poliúria, polidipsia, proteinúria. Itens esses que em suas maiores intensidades poderiam acrescentar até 20 pontos ao escore.

Como havia mais de um médico veterinário realizando a coletas e o exame físico, outros itens cuja avaliação poderia ser subjetiva foram modificados, de forma que apenas a presença ou ausência desses sinais fosse relatada. Esses itens foram: lesões cutâneas, hepatoesplenomegalia, epistaxe,

vômito, diarreia, claudicação, pigmentação alterada, hiperqueratose e onicogribose. Com essa modificação, esses itens deixam de acrescentar, em sua intensidade máxima 21 pontos. Os parâmetros do escore clínico modificado foi validado em campo por meio de estudo piloto no qual foram realizadas 20 avaliações por dois médicos veterinários. O escore final aplicado no estudo passou a ter pontuação máxima de 46 pontos, ao invés dos 87 do escore original, conforme Teixeira et al. (2019).

Coleta, transporte e armazenamento de amostras biológicas

Foi coletado sangue periférico (veia cefálica, veia safena ou veia jugular), com seringa de 3 mL e agulha 25x0,7 mm. O sangue coletado foi armazenado em dois tubos, um com anticoagulante EDTA para realização dos testes moleculares, e outro sem anticoagulante, para realização dos testes sorológicos.

As amostras foram transportadas sob refrigeração entre 4°C e 8°C até o Laboratório de Leishmanioses NMT/UnB. Imediatamente após a chegada ao laboratório, o soro foi separado por centrifugação à 1512g durante 3 minutos. O sangue total e o soro foram conservados a - 20°C até o momento da realização dos testes sorológicos ou moleculares.

A coleta do aspirado da medula óssea foi realizada, sob sedação, no esterno. A sedação foi feita com quetamina (8 mg/kg) associado a acepromazina (0,1 mg/kg) por via intramuscular. Após a sedação, os animais foram colocados sobre uma mesa de aço inoxidável para tricotomia e assepsia sequencialmente com água e sabão, álcool iodado e álcool 70%. A coleta foi realizada com seringa descartável de 20 mL e agulha calibre 40x1,2 mm.

Definição de caso de infecção

Foi considerado infectado o cão que apresentou resultado positivo em qualquer um dos esquemas de diagnóstico: parasitológico direto; cultura do

parasito; PCR com alvo ITS1; sorologia TR DPP (Biomanguinhos®) e sorologia ELISA (EIE-LVC) (Biomanguinhos®), sequencialmente; sorologia TR DPP (Biomanguinhos®) e sorologia ELISA (Rk39), sequencialmente. Foi considerado como não caso o cão que apresentou resultados negativos em todos os esquemas de diagnóstico mencionados acima.

Testes de Diagnóstico

Os testes de diagnóstico: parasitológico direto; cultura do parasito; PCR com alvo ITS1; sorologia TR DPP (Biomanguinhos®) e sorologia ELISA (EIE-LVC) (Biomanguinhos®), sequencialmente; sorologia TR DPP (Biomanguinhos®) e sorologia ELISA (Rk39), sequencialmente foram realizados conforme metodologia descrita no trabalho de Teixeira et al. (2019). E quando foram realizados os profissionais não tinham conhecimento dos cães fonte das amostras e nem dos outros resultados.

Estatísticas

Foram realizadas análises descritivas dos dados, com cálculos de prevalência de doença/infecção e intervalos de confiança de 95%. Posteriormente iniciou-se a etapa analítica com a análise bivariada e as respectivas razões de prevalência, em que as variáveis com nível de significância com $p\text{-valor} \leq 0,2$ foram selecionadas para a análise multivariada por meio da Regressão de Poisson.

Para essas análises, as variáveis do escore de sinais clínicos e escore poder aquisitivo foram tornadas categóricas por meio de uma análise de quartis. A idade referida dos cães não foi considerada nessa fase analítica em função do grande viés de memória observado durante a coleta de informações.

Realizou-se uma regressão hierárquica de Poisson com variância robusta utilizando como exposição proximal o bloco de aspectos do proprietário e cuidados com os cães, como intermediário o bloco de características do

ambiente residencial e como distal os fatores biológicos. E para essas análises foi utilizado o programa Stata versão 13.

Considerações éticas

Todos os protocolos foram elaborados para reduzir o sofrimento animal e todos os proprietários foram esclarecidos sobre os riscos dos procedimentos e sobre os riscos de leishmaniose visceral, tanto para a população humana quanto canina, bem como obtiveram acesso aos resultados dos exames. O estudo foi aprovado na Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UnB sob o número UnBDoc 11253/2015. Em conformidade com a Lei 11.794 de 8 de Outubro de 2008 (Brasil 2008).

RESULTADOS

Foram selecionados 160 cães pertencentes a 112 proprietários. A média do número de cães por proprietário foi de 1,47 cães. Dentre os 112 proprietários, 76 (67,9%) possuíam 1 cão participante, 26 (23,2%) 2 cães participantes e 10 (8,9%) mais de 2 cães participantes. Houve 28 recusas e cinco cães foram excluídos por serem cardiopatas graves e um cão foi excluído por ter sido vacinado contra a leishmaniose visceral. Dos questionários aplicados relativos as informações dos proprietários, residências e cuidados ofertados aos cães, 109 foram considerados válidos e três inválidos.

As famílias foram classificadas com o escore de poder aquisitivo com valor médio de 17,45 pontos, desvio padrão de 5,70, sendo a maior frequência de proprietários pertencentes às classes C1 e C2, com renda familiar bruta média de R\$ 895,00 até R\$ 1277,00.

Quanto às características dos animais selecionados, do total de 160 cães, 71 (44,4%) eram fêmeas e 89 (55,6%) machos. A idade referida foi em média de 3,06 anos (DP 2,86 anos; intervalo de 4 meses até 15 anos).

Houve dados dos sinais clínicos disponíveis de 158 cães, dos quais, 53,79% (85/158) eram assintomáticos (escore menor ou igual a 1 ponto), 46,21% (73/158) eram sintomáticos (escore maior ou igual a 2). A frequência dos sinais clínicos observados nos cães infectados e não infectados:

Tabela I – Frequências absolutas e relativas de cada sinal clínico observado nos cães infectados e não infectados. Brasília 2015-2017

		Infectados	Não infectados	p-valor
Condição corporal	Obeso/Normal	35/42 (83,33%)	99/116 (85,34%)	0,926
	Magro	3/42 (7,14%)	14/116 (12,06%)	0,423
	Caquexia	4/42 (9,53%)	3/116 (2,58%)	0,078
Mucosas	Hipocorada	8/42 (19,04%)	18/116 (15,38%)	0,657
Desidratação	Leve	1/42 (2,38%)	2/116 (1,71%)	0,793
	Moderada a Intensa	1/42 (2,38%)	1/116 (0,85%)	0,458
Atrofia muscular em algum membro	Leve	1/42 (2,38%)	1/116 (0,85%)	0,458
Lesões Cutâneas	Presente	13/42 (30,96%)	36/116 (31,04%)	0,994
Hepatoesplenomegalia	Presente	5/42	9/116	0,462

		(11,91%)	(7,76%)	
Conjuntivite e/ou Ceratite	Unilateral e leve	2/42 (4,76%)	2/116 (1,71%)	0,298
	Unilateral severa/bilateral	5/42 (11,90%)	7/116 (6,03%)	0,260
Uveíte e/ou Blefarite	Unilateral e leve	1/42 (2,38%)	0/116	0,099
	Unilateral severa/bilateral	2/42 (4,76%)	5/115 (4,31%)	0,907
Linfoadenomegalia	1 a 2 linfonodos	12/42 (28,57%)	29/116 (25,0%)	0,730
	3 ou mais Generalizada	6/42 (14,28%)	14/116 (12,07%)	0,746
Úlceras e/ou Nódulos na boca	1 a 2	1/42 (2,38%)	0/116	0,099
Diarreia	Presente	3/42 (7,14%)	5/116 (4,31%)	0,498
Claudicação	Presente	0	1/116 (0,85%)	0,548
Eritrema	1 a 25% do corpo	0	2/116 (1,72%)	0,396
Dermatite esfoliativa seca	1 a 25% do corpo	7/42 (16,66%)	13/116 (11,21%)	0,427
	25 a 40% do corpo	2/42 (4,76%)	4/116 (3,44%)	0,714

	40% ou mais do corpo	1/42 (2,38%)	5/116 (4,31%)	0,588
Dermatite ulcerativa	1 a 25% do corpo	3/42 (7,14%)	3/116 (2,58%)	0,207
	25 a 40% do corpo	0	1/116 (0,85%)	0,548
	40% ou mais do corpo	1/42 (2,38%)	0	0,099
Dermatite nodular	1 a 25% do corpo	2/42 (4,76%)	0/116	0,021
	25 a 40% do corpo	0	1/116 (0,85%)	0,548
	40% ou mais do corpo	1/42 (2,38%)	1/116 (0,85%)	0,458
Dermatite pustular	25 a 40% do corpo	0	1/116 (0,85%)	0,458
	40% ou mais do corpo	1/42 (2,38%)	0	0,099
Alopecia	1 a 25% do corpo	3/42 (7,14%)	8/116 (6,89%)	0,960
	25 a 40% do corpo	2/42 (4,76%)	2/116 (1,72%)	0,298
	40% ou mais do corpo	1/42 (2,38%)	1/116 (0,85%)	0,458
Pigmentação alterada	Presente	2/42	5/116	0,907

		(4,76%)	(4,31%)	
Hiperqueratose das trufas e coxins	Presente	3/42 (7,14%)	2/116 (1,72%)	0,100
Onicogribose ^a	Presente	4/42 (9,52%)	2/116 (1,72%)	0,032

^a Os valores do escore clínico dos cães infectados e que apresentavam onicogribose foram: 6, 11, 14 e 26. Dos que não apresentaram foram 3 e 14.

Foi possível realizar aspirado de medula óssea em 62,5% (100/160). A positividade dos exames parasitológicos nos cães que realizaram o aspirado de medula óssea foi 2% (2/100) para o isolamento do parasito em cultura e 8% (8/100) na pesquisa direta do parasito.

A PCR de kDNA foi realizada em todas as amostras de DNA extraídas de sangue total e do material aspirado da medula óssea. Do total de 160 amostras de sangue, 88 (55%) foram positivas e, das 100 amostras de medula óssea, 56 (56%) foram positivas. Essas amostras positivas foram submetidas à PCR com alvo de amplificação do ITS1 e a positividade observada foi de 14/88 (15,90%) em amostras de sangue total e 13/56 (23,21%) em amostras de medula óssea. Assim, 26/160 animais (16,25%) foram considerados positivos conforme o parâmetro utilizado para a definição de caso de infecção. Desses, 12 animais apresentaram positividade unicamente na medula óssea, 13 unicamente no sangue periférico e um animal foi positivo tanto em sangue periférico quanto na medula óssea.

Quanto aos exames sorológicos, 25/160 animais foram positivos no TRDPP (Biomanguinhos®) e 24/160 foram positivos no EIE-LVC (Biomanguinhos®). Porém apenas 15 (9,38%) animais foram positivos em ambos os testes. Por outro lado, na combinação TRDPP (Biomanguinhos®) e ELISA rk39, somente 19 (11,88%) foram positivos em ambos os testes. Dessa forma,

considerando os critérios estabelecidos na metodologia para a definição de caso de infecção, foram identificados 42 cães infectados. A frequência absoluta de positividade em todos os testes está representada e a concordância bruta estão na tabela a seguir.

Tabela II- Frequência absoluta de resultados positivos concordantes entre os exames de diagnóstico realizados em cães residentes na região administrativa da Fercal, Distrito Federal 2015-2017.

	Parasitológico direto (n=100)	Cultura (n=100)	PCR kDNA ST (n=160)	PCR kDNA MO (n=100)	PCR ITS1 ST (n=88)	PCR ITS1 MO (n=56)	TR- DPP (n=160)	ELISA EIE-LVC (n=160)	ELISA rk39 (n=160)
Parasitológico direto (n=100)	8	1	0	1	0	1	2	1	2
Cultura (n=100)		2	1	2	0	1	2	2	2
PCR kDNA ST (n=160)			88	33	14	6	17	13	30
PCR kDNA MO (n=100)				56	5	13	13	13	20
PCR ITS1 ST (n=88)					14	1	4	2	5
PCR ITS1 MO (n=56)						13	9	6	9
TR-DPP (n=160)							25	15	19
ELISA EIE- LVC (n=160)								24	17
ELISA rk39 (n=160)									46

A prevalência estimada de cães infectados foi 26,25% (IC95%: 20,05 a 33,57). Dos 42 cães infectados, apenas 22 apresentaram escore de sinais compatível com LVC maior ou igual a 2, sendo considerados sintomáticos. Portanto, a prevalência de doença na amostra estudada foi de 13,75% (IC95%: 9,26 a 19,94). Não houve diferença estatisticamente significativa na

mediana entre a pontuação do escore clínico entre cães infectados e não infectados. Figura 3.

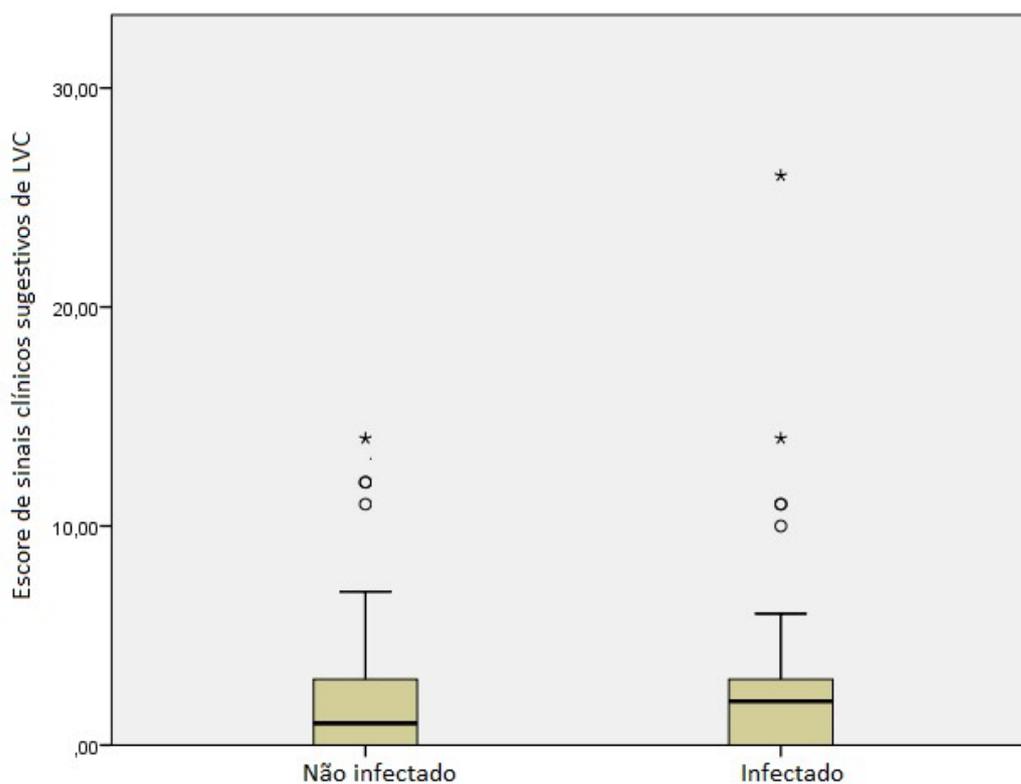


Figura III - Distribuição do escore clínico de LVC nos grupos de animais infectados e não infectados, Brasília 2017. 118 cães não infectados, mediana 1 (IQR:0-3; intervalo 0-14 pontos). 42 cães infectados, mediana 2; (IQR:0-3; intervalo 0-26 pontos). (Mann-Whitney U test; $p=0,377$).

A soroprevalência estimada, utilizando a testagem sequencial TRDPP/EIE-LVC, foi de 15/160 animais ou 9,38% (IC95% 5,76 a 14,89). E, a soroprevalência estimada, usando a testagem sequencial TRDPP/ELISA rK39, foi de 19/160 cães ou 11,88% (IC95% 7,74 a 17,80).

Para a análise bivariada, o cálculo da análise de quartis do escore de sinais clínicos sugestivos de LVC e do escore de poder aquisitivo e sua transformação em variável categórica podem ser verificados na tabela SII.

A tabela III apresenta a análise bivariada dos fatores biológicos possivelmente associados a LVC, observar que somente dois fatores (o pelo curto e a pelagem clara) que apresentaram associação ($\leq 0,2$). A idade não foi utilizada na análise porque durante a coleta observou-se um grande viés de memória em relação a idade que os proprietários referiam e o aspecto do animal.

Tabela III – Análise bivariada dos fatores biológicos associados a leishmaniose visceral canina, Brasília 2015-2017.

Variáveis	N	Exposição	Proporção de infectados entre os expostos	Proporção de infectados entre os não expostos	p valor ^a	Razão de Prevalências (IC 95%)
Sexo	160	0–Masculino	19/71	23/89	0,896	1,035 (0,614-1,744)
		1– Feminino	(26,7%)	(25,8%)		
Pelagem	155	0– Pelo não curto	37/119	5/36	0,042	2,238 (0,905-5,270)
		1– Pelo curto	(31,1%)	(13,9%)		
Cor da pelagem	143	0 – Pelagem não clara	18/50	20/93	0,061	1,674 (0,979-2,861)
		1 – Pelagem clara	(36,0%)	(21,5%)		
Estrutura corporal	160	0 – Normal ou obeso	7/20	35/140	0,342	1,400 (0,721-2,715)
		1 – Algum grau de magreza	(35,0%)	(25,0%)		
Animais com sinais clínicos > 2 pontos	158	0 – Até 1 ponto	22/73	19/85	0,266	1,348 (0,795-2,286)
		1 – maior do que 2 pontos	Ter 2 ou mais pontos de escore clínico	(30,1%)		

Na análise bivariada dos fatores relacionados ao ambiente em que o animal reside associadas a LVC apresentada na tabela III, todos os fatores apresentaram associação ($\leq 0,2$).

Tabela IV – Análise bivariada dos fatores relacionados ao ambiente em que o animal reside associados a leishmaniose visceral canina, Brasília 2015-2017.

Variáveis	N	Exposição	Proporção de infectados entre os expostos	Proporção de infectados entre os não expostos	p valor ^a	Razão de Prevalências (IC 95%)
Presença de outros animais (qualquer espécie)	156	Cão cujo proprietário declarou que seu animal convive com outros animais	28/116 (24,1%)	14/40 (35,0%)	0,182	0,689 (0,405-1,173)
Ter quintal na área residencial	156	O cão ser domiciliado em uma residência com quintal	41/143 (28,7%)	1/13 (7,7%)	0,188	3,727 (0,557-24,938)
Área do quintal com predominância de terra e/ou vegetação	156	O cão ser domiciliado em uma residência com quintal com área gramada ou com terra	39/117 (33,3%)	3/39 (7,7%)	0,002	4,333 (1,418-13,241)
Presença de matéria orgânica acumulada no quintal	156	Presença de matéria orgânica no quintal (restos de plantas, lixo orgânico.)	23/70 (32,9%)	19/86 (22,1%)	0,132	1,487 (0,884-2,499)
Janelas teladas na residência	156	A residência ter janelas teladas	3/21 (14,3%)	39/135 (28,9%)	0,160	0,494 (0,167-1,475)

E na análise bivariada dos fatores de exposição relacionados aos cuidados com os animais realizados pelos proprietários associados a LVC, todos os fatores apresentaram associação ($\leq 0,2$).

Tabela V – Análise bivariada dos fatores relacionados aos cuidados com os animais pelos seus proprietários associados a leishmaniose visceral canina, Brasília 2015-2017.

Variáveis	N	Exposição	Proporção de infectados entre os expostos	Proporção de infectados entre os não expostos	p valor ^a	Razão de Prevalências (IC 95%)
Animal recebeu alguma vacina contra qualquer enfermidade ^a	156	Ter recebido alguma dose de vacina para prevenção de alguma enfermidade	30/127 (23,6%)	12/29 (41,4%)	0,052	0,570 (0,334-0,974)
Proprietário conhece sintomas da LV em humanos	155	Animal cujo proprietário declarou saber como são os sintomas da LVH	8/17 (47,1%)	34/138 (24,6%)	0,127	1,910 (1,066-3,420)
Compareceu com o cão a pelo menos uma consulta com veterinário no último ano	155	Animal cujo proprietário declarou que o levou a pelo menos uma consulta com médico veterinário no último ano	4/31 (12,9%)	37/124 (29,8%)	0,056	0,432 (0,166-1,122)
Maior escore de poder aquisitivo	156	Ter 16 pontos ou mais de escore de poder aquisitivo	29/89 (32,6%)	13/67 (19,4%)	0,066	1,679 (0,947-2,976)

a – Esse foi um marcador geral do cuidado com os cães, qualquer vacina contra qualquer enfermidade foi marcada aqui. Os cartões de vacina foram verificados.

Com os fatores de exposição que apresentaram pelo menos associação com significância estatística moderada na análise bivariada ($p \leq 0,2$) foram realizados os modelos de regressão hierárquica de Poisson. No primeiro modelo, conforme a tabela V, os fatores de cuidado foram considerados a categoria proximal e biológicos a distal.

Tabela VI – Análise de regressão hierárquica de Poisson com fatores de cuidados como categoria de exposição proximal e biológicos como categoria de exposição distal.

	Razão de Prevalências não ajustada (IC 95%)	Razão de Prevalências Ajustada (IC 95%)	p valor
Pelagem (curta)	2,238 (0,905-5,270)	2,331 (1,023-5,216)	0,044
Área do quintal com predominância de terra e/ou vegetação	4,333 (1,418-13,241)	4,153 (1,351-12,766)	0,013
Maior escore de poder aquisitivo	1,679 (0,947-2,976)	2,027 (1,156-3,554)	0,014

Discussão

A prevalência de infecção identificada no presente estudo foi mais alta (26,25% - IC95%: 20,05 a 33,57) do que as anteriormente registradas nas áreas endêmicas do DF. Em estudos anteriores, a prevalência relatada oscilou entre 7 e 14% (Brasil 2013; Silva 2017). Isso se deve provavelmente ao uso combinado de um número maior de técnicas de diagnóstico no presente estudo, destacando-se a PCR, que, por possuir maior sensibilidade, permitiu a detecção de um número maior de animais infectados (Lopes et al. 2016; Teixeira et al. 2019).

A maior sensibilidade na detecção dos cães infectados resultou numa diferença de 12,5% entre a prevalência da infecção (26,25% - IC95%: 20,05 a 33,57) e a prevalência da doença (13,75% - IC95%: 9,26 a 19,94). A detecção desse grupo de cães assintomáticos-infectados é importante em termos de vigilância epidemiológica, ainda mais porque nessa região houve relatos de casos autóctones de LV humana (Carranza-Tamayo et al. 2016; Carranza-Tamayo et al. 2010). Os problemas de detecção dos animais infectados ainda é mais preocupante quando se verifica a estimativa de

soroprevalência de infecção baseada na combinação de resultados dos testes TRDPP/EIE-LVC (Brasil, 2011), atualmente recomendados pelo programa de controle da doença (9,38% – IC95% 5,76-14,89), que foi marcadamente menor do que a estimativa obtida pela combinação de metodologias que incluíram o diagnóstico molecular. A subdetecção de casos de infecção canina assintomática causada pela falta de sensibilidade dos métodos recomendados na rotina já foi destacada por outros autores como possível fator associado à falta de efetividade (Laurenti et al. 2013; Lopes et al. 2017; Borja et al. 2016).

Não houve diferença significativa entre o escore de sinais clínicos dos cães infectados e não infectados, bem como houve cães com sintomatologia sugestiva que não estavam infectados com leishmaniose e possivelmente estavam afetados por outras doenças que não foram especificamente investigadas neste estudo. O único achado clínico que foi significativamente associado à LVC foi onicogribose, observação compatível com a literatura, que relata a onicogribose como um dos sinais clínicos mais frequentemente associados a cães com LV (Solano-Gallego et al. 2011; Gouvêa et al. 2016; Ribeiro et al. 2017). Esta observação é consistente com a percepção de que a síndrome clínica associada a LVC é inespecífica.

Foi utilizada a regressão de Poisson com ajuste robusto para explorar as relações entre os fatores de exposição e o desfecho de infecção, sendo estabelecidas categorias de exposição proximais e distais dentro de relações hierárquicas para o desenvolvimento dos modelos. Essa técnica tem sido indicada para se trabalhar com razões de prevalência em estudos transversais, pois produz um ajustamento adequado, sem sofrer o efeito da magnitude da prevalência do evento de interesse (Barros et al. 2003). A comparação entre os dois modelos regressivos produzidos com as duas organizações hierárquias escolhidas revelou que ambos os modelos tiveram medidas de associação aproximadas para dois fatores de exposição e diferiram somente em uma, a pelagem curta que foi incluída no primeiro

modelo (Tabela V) e não no segundo (Tabela VI). Essa semelhança entre os modelos ressalta a consistência das associações identificadas e apontam o primeiro modelo como o mais adequado por ter produzido estimativas mais precisas.

Dentre as características dos cães, a pelagem curta foi o fator de exposição que apresentou associação no primeiro modelo regressivo para justificar sua incorporação (RP ajustada de 2,331 (IC 95% 1,023-5,216); p valor = 0,044). A pelagem curta é uma característica que tem sido associada ao risco de LVC também em outros estudos, provavelmente porque cães de pelagem curta podem atrair mais vetores do que os de pelagem longa, talvez seja pelo padrão de radiação de calor corporal ou de liberação de CO₂ (Belo et al. 2013). O trabalho de Coura-Vital et al. (2013), por exemplo, identificou um *Hazard Ratio* (HR de 1,9 (IC95% 1,1 a 3,4); Leal et al. (2018) identificaram *Odds Ratio* de 1,8 (IC95% 1,5 a 2,1); e Chagas (2017), OR de 2,56 (IC95% 2,15 a 3,05) para a associação entre pelagem curta e a presença de infecção por *Leishmania*.

Dos fatores relativos ao ambiente em que o animal vive revelou-se associado ao risco de LVC: a presença de quintal na residência com a predominância de terra e/ou vegetação no quintal [RP ajustada no modelo 1 de 4,153 (IC95% 1,351-12,766); RP ajustada no modelo 2 de 4,389 (IC95% 1,39 a 13,84)]. Esse resultado em conjunto com outros trabalhos reforçam a ideia de como as características do ambiente são importantes no processo de transmissão e manutenção dessa enfermidade (Figueiredo et al. 2017; Abrantes et al. 2018). No entanto, as intervenções ambientais podem ser inviáveis na prática por terem externalidade negativa clara, tal como a redução de cobertura vegetal, o que impõe o desafio de intervenções dirigidas a proteger os cães contra a picada do vetor. Destarte, o uso de coleiras com repelentes tem sido recentemente investigado com resultados promissores (Silva et al. 2018; Lopes et al. 2018; Coura-Vital et al. 2018; Kazimoto et al. 2018; Alves et al. 2018). Por outro lado, as intervenções que

melhoram o ambiente, tais como a coleta adequada de resíduos sólidos (Silva et al. 2012; Coura-Vital et al. 2013; Ursine et al. 2016), que tem externalidade positiva, sempre devem ser encorajados dentre as medidas recomendadas para reduzir a carga da infecção na comunidade; embora, se careça de estudos específicos para conhecer a magnitude do seu impacto potencial sobre a transmissão da LVC.

Apesar da LVH ter sido tradicionalmente associada à pobreza (Alvar et al. 2012; WHO, 2016), no presente estudo observou-se associação significativa entre o maior poder aquisitivo dos proprietários e a possibilidade de adoecer por LVC. O fator esteve consistentemente associado em ambos os modelos. Trata-se de uma associação que não tinha sido descrita previamente na literatura. As hipóteses que explicariam esta associação podem estar relacionadas ao fato de que proprietários com melhor condição socioeconômica teriam maior possibilidade de oferecer cuidados aos animais o que redundaria em maior probabilidade de sobrevivência em relação a outras condições letais e preveníveis por vacinação (e.g. cinomose e parvovirose) (Day et al. 2016), ou quando esse animal sobrevive, essas doenças poderiam desencadear alguma imunodeficiência. Portanto, aumentando o tempo de exposição ao risco de infecção por LV, bem como a susceptibilidade do animal. Também, a oferta de melhor alimentação poderia manter o cão mais saudável, e mesmo infectado por leishmaniose, sobreviveria por mais tempo. Esta associação pode ser muito desafiadora no marco atual das recomendações que incluem a eutanásia de cães infectados, pois os proprietários com melhor poder aquisitivo podem ser os que, mais frequentemente, se recusam a entregar os cães infectados o que (Zuben & Donalísio 2016) faz que permaneçam no ambiente como reservatórios da doença para outros cães e para a população humana. A presente observação relacionada ao status socioeconômico dos proprietários contribui para levantar novas hipóteses para explicar a falta de efetividade do atual modelo de controle que tem falhado em impedir a

dispersão territorial da enfermidade (Brasil, 2014a; Abrantes et al., 2016; Campos et al., 2017; Sales et al., 2017).

O papel do cão assintomático como reservatório, em termos epidemiológicos, pode ser até mais importante do que o papel da população de cães doentes que se apresentam numa menor proporção, fato este que tem sido abordado em outros trabalhos (Esteva et al. 2017; Zou et al 2017). Apesar do cão assintomático transmitir *Leishmania* spp. para o vetor em uma menor taxa do que os cães sintomáticos (Laurenti et al. 2013; Courtenay et al. 2014), eles podem representar um contingente numericamente maior de animais que estariam servindo como reservatórios. No mais, o cão sintomático que tradicionalmente sofre intervenções, seja remoção por eutanásia ou tratamento, constituem parcela menor da população, como demonstrado neste estudo.

O uso do escore de poder aquisitivo do proprietário como fator de exposição abre um debate para futuros estudos sobre o papel dos proprietários no processo de prevenção da LVC que até agora permanecia com foco quase exclusivo nas ações das equipes de vigilância epidemiológica dedicadas ao manejo de zoonoses. O sucesso de novas intervenções profiláticas, tais como o uso de coleiras impregnadas com inseticidas, repelentes orais ou até mesmo vacinas certamente dependerão da participação dos proprietários para garantir o uso adequado a reposição oportuna de coleira ou da administração de outros medicamentos e vacinas que podem guardar relação direta ou indireta com o status socioeconômico dos proprietários, influenciando na efetividade das intervenções.

O estudo possui as limitações inerentes a um estudo transversal que não permite que sejam averiguadas as relações de causa e efeito. Também deve ser considerada a limitação imposta pela ausência de exames laboratoriais complementares às informações clínicas o que poderia ter auxiliado na identificação de alguns impactos da infecção sobre a função renal,

condições hematológicas e condições nutricionais dos animais aparentemente saudáveis. A possibilidade de viés de observação também deve ser considerada, tendo em vista que houve vários observadores avaliando e registrando as condições clínicas dos animais estudados e aplicando os questionários. Nesse sentido, foram realizados esforços para minimizar o viés de observação na avaliação clínica, como a execução de um projeto piloto prévio (Teixeira et al. 2019), bem como houve mascaramento dos dados clínicos para a realização das técnicas diagnósticas.

Além das limitações citadas, na compreensão do significado do maior escore de poder aquisitivo estar associado com a maior prevalência de leishmaniose visceral canina deve-se considerar a possibilidade de um viés de sobrevivência. Isto é, todas as hipóteses aqui discutidas podem ter sofrido o efeito decorrente da maior probabilidade de sobreviver quando um cão tem um tutor com maior poder aquisitivo. O que não diminui a importância que o cão assintomático poderia ter na manutenção da leishmaniose visceral em uma comunidade. E, exatamente por isso, estudos posteriores deverão ter um cuidado metodológico para poder fazer essa distinção. Os resultados desses estudos podem influenciar na metodologia de controle a ser executada com esses cães.

Em conclusão, o estudo permitiu identificar três fatores relevantes associados à infecção por *Leishmania* numa população canina predominantemente assintomática, destacando-se como o primeiro relato de associação de maior status socioeconômico do proprietário com o maior prevalência de infecção.

Agradecimentos

O estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal -FAPDF- processo 193.000.867/2015 e CNPq processo 142247/2015-4. Sinceros agradecimentos Médico Veterinário Laurício

Monteiro Cruz, ao Biólogo Antonio Fonseca da Cunha Neto e à toda equipe da Diretoria de Vigilância Ambiental do Distrito Federal pela execução dos testes TR-DPP e ELISA. A Ana Paula Samapio Cardoso e Ana Claudia Negret Scalia pela execução das PCRs e auxílio técnico no laboratório. E ao grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Instituto René-Rachou-FIOCRUZ de Belo Horizonte pela execução do teste de ELISA rK 39.

REFERÊNCIAS

ABEP. 2012. Alterações na aplicação do Critério Brasil. São Paulo: Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa. <http://www.abep.org/Servicos/Download.aspx?id=03> Acessado em 2 de fevereiro de 2014.

Abrantes TR, Werneck GL, Almeida AS, Figueiredo FB, Brazil environmental factors associated with canine visceral leishmaniasis in an area with recent introduction. *Cad Saude Pub.* 2018. 34(1): 1–12.

Akhound M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Neg Trop Dis.* 2016; 10 (3): e0004349.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012; 7 (5) e35671.

Alves EB, Figueiredo FB, Werneck GL. Dificuldades operacionais no uso de coleiras caninas impregnadas com inseticida para o controle da leishmaniose visceral, Montes Claros, MG, 2012. *Epidemiol Serv Saude.* 2018; 27 (4): e2017469.

Barros AJ, Hirakata VN. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC Med Res Methodol.* 2003; 3: 21.

Belo VS, Struchiner CJ, Werneck GL, et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* Infection in dogs in Brazil. *Vet Parasitol.* 2013; 195: 1–13.

Bezerra JMT, Araújo VEM, Barbosa DS, Martins-Melo FR, Werneck GL, Carneiro M. Burden of Leishmaniasis in Brazil and Federated Units, 1990-2016: Findings from global burden of disease study 2016. *Plos Negl Trop Dis.* 2018; 12 (9): e0006697.

Bögel K, Frucht K, Drysdale G, Remfry J, World Health Organization. Veterinary Public Health Unit. et al. (1990). Guidelines for dog population management / preparation; editing co-ordinated by Frucht K, Drysdale G and Remfry J Geneva: World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/61417> Acesso em 03 Fev 2014.

Borja LS, Sousa OMF, Solcà MS, Bastos LA, Bordoni M, et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. Vet Parasitol. 2016; 229:110–117

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. 120p.: il. Color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf Acesso 8 de Março 2014

Brasil. 2008. Lei 11794 de 8 de outubro de 2008. Brasil. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm Acesso 8 de Março 2014

Brasil, DIVAL/GEVAZ/GDF 2013. Informativo Ambiental Das Leishmanioses No DF. Brasília. Disponível em: http://www.saude.df.gov.br/images/Informativos/DIVAL/Informativo_AmbientaI_2013_Leishmanioses_EM_PDF.pdf Acesso 12 de Março 2014

Brasil, MS/SVS/DVIT - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Nota Técnica Conjunta 01/2011. Brasília: CGDT/CGLAB/DVIT/ SVS/MS; 2011

Campos MP, Luca PM, Renzetti ARS, Souza SMM, Mendes-Júnior AAV, Barros RS, Figueiredo, FB. Can vaccines against canine visceral leishmaniasis interfere with the serological diagnostics recommended by the Brazilian Ministry of Health? Ciência Rural. 2017; 47 (4): 1–6.

Carranza-Tamayo, C O, Carvalho MS, Bredt A, Bofil MI, Rodrigues RM et al. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasilia, Federal District, Brazil. Rev Soc Bras MedTrop. 2010; 43 (4): 396–9.

Carranza-Tamayo CO, Werneck GL, Romero GAS, Are opossums a relevant factor associated with asymptomatic *Leishmania* infection in the outskirts of the largest brazilian cities? Braz J Infect Dis. 2016; 20(2) 119-126.

Carvalho IS, Peixoto HM, Romero GAS, OliveirA MRF. Cost of visceral leishmaniasis care in Brazil. Trop Med Int Health. 2017; 22 (10): 1579–1589.

Castro JM, Rodrigues SM, Tarso S. et al. Conhecimentos, percepções de indivíduos em relação à leishmaniose visceral humana como novas ferramentas de controle. *Ensaio Cienc Biol Agr Saude*. 2016; 20(2):93-103.

Constantino C, Pasquali AKS, Caldart ET, Ferreira FF et al. Seroepidemiology of *Leishmania* spp. in dogs residing in Telêmaco Borba, Paraná, Brazil. *Semina: Ciênc. Agrár*. 2014; 35 (6): 3181–90.

Costa KFL, Amóra SSA, Coutinho CFA, Souza CSF, et al. Awareness of visceral leishmaniasis and its relationship to canine infection in Riverside endemic areas in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014; 47(5): 607-12

Coura-Vital W, Leal GGA, Marques LA, Pinheiro AC, Carneiro M, Reis AB. Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: A large scale intervention study in an endemic area. *PLoS One*. 2018; 13 (12): e0208613.

Coura-Vital W, Reis AB, Fausto MA, Leal GGA, Marques MJ, Veloso VM, Carneiro M. RISK Factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from an endemic area of Brazil. *PLoS One*. 2013; 8 (8): e71833.

Courtenay O, Carson C, Calvo-Bado L, Garcez R, Quinnell JR. Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8 (1): e2583.

Day MJ, Horzinek MC, Schultz RD, Squires RA. Guidelines for vaccination of dogs and cats. *Journal of small animal practice*. 2016; 57 (1): 1–30.

Esteva L, Vargas C, Vargas-de-León C. The role of asymptomatics and dogs on leishmaniasis propagation. *Math Biosci*. 2017; (293):46-55.

Figueiredo ABF, Werneck GL, Cruz MSP, Silva JP, Almeida AS. Uso e cobertura do solo e prevalência de leishmaniose visceral canina em Teresina, Piauí, Brasil: uma abordagem utilizando sensoriamento remoto orbital. 2017 *Cad Saude Pub* 33 (10): 1–13.

Gouvêa MV, Mendonça IV, Cruz MSP, Costa CHN et al. Predictive factors for *Leishmania infantum* infection in dogs examined at a veterinary teaching hospital in Teresina, State of Piauí, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016; 49 (1): 107–11.

Kazimoto TA, Amora SSA, Figueiredo FB, Magalhães JM, Freitas, YABN et al Impact of 4% deltamethrin-impregnated dog collars on the prevalence and

incidence of canine visceral leishmaniasis. Vector Borne Zoonotic Dis. 2018; 18(7): 356-363.

Lainson, R. The Neotropical *Leishmania* species: A brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. Rev Pan-Amazônica de Saúde, 2010; 1 (2): 13–32.

Laurenti MD, Rossl CN, Matta VLR DA, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. Vet Parasitol. 2013; 196(3–4):296–300.

Leal GGA, Carneiro M, Pinheiro AC, Marques LA, Ker HG, Reis AB. Risk profile for *Leishmania* infection in dogs coming from an area of visceral leishmaniasis reemergence. Prev Vet Med. 2018; 150:1–7.

Lopes EG, Sevá AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB, et al. Vaccine Effectiveness and use of collar impregnated with insecticide for reducing incidence of *Leishmania* infection in dogs in an endemic region for visceral leishmaniasis, in Brazil. Epidemiol Infect. 2018; 146(3): 401-406.

Lopes EG, Sevá AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. Epidemiol Infect. 2017; 145(12):2436-2444.

Lopes EG, Geraldo-Junior CA, Marcili A, Silva RD, Keid LB, et al. Performance of conventional PCRs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of *Leishmania* spp. Rev Inst Med Trop de São Paulo. 2016; 58: 41.

Machado CJS, Silva EG, Vilan RMI. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. Saúde e Sociedade. 2016; 25 (1): 247–58.

Raggio LR, Magnanini MMF. A lógica da determinação do tamanho da amostra em investigações epidemiológicas. 2000. Cad Saúde Coletiva 8 (2): 9–28.

Rocha ICM, Santos LHM, Coura-Vital W, Cunha GMR, Magalhães FC, Morais M, et al. Effectiveness of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Surveillance and Control Programme in reducing the prevalence and incidence of *Leishmania infantum* infection. Parasit Vectors. 2018;11:1–12.

Sevá AP, Mao L, Galvis-Ovallos F, Lima JMT, Valle D. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. Plos Negl Trop Dis. 2017; 11 (2): e0005353.

Silva GJ, Silva ET, Costa GRT, Santos IB. Vigilância da leishmaniose visceral no Distrito Federal: aspectos organizacionais, situação epidemiológica e medidas intersetoriais, Com Ciências Saúde. 2017; 28(2): 149-157.

Silva RA, Andrade AJ, Quint BB, Raffoul GES, Werneck GL, et al. Effectiveness of dog collars impregnated with 4 % deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. Mem Inst Oswaldo Cruz 2018; 113 (5): e170377.

Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. Parasit Vectors 2011; 4: 86.

Teixeira AIP, Silva DM, Vital T, Nitz N, et al. Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018; 114: e180452.

Ursine RL, Dias JVL, Morais HA, Pires HHR. Human and canine visceral leishmaniasis in an emerging focus in Araçuaí, Minas Gerais: spatial distribution and socio-environmental factors. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016; 111 (8): 505–11.

Werneck GL. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. Rev Saude Publica. 2014; 48 (5): 851–6.

Zou L, Chen J, Ruan S. Modeling and analyzing the transmission dynamics of visceral leishmaniasis. Math Biosci Eng. 2017; 14(5):1585–604.

Zuben APB, Donalísio MR. Difficulties in implementing the guidelines of the Brazilian visceral leishmaniasis control program in large cities. Cad Saude Publica, 2016; 32 (6): e00087415.

Arquivos Suplementares

Tabela SI – Análise da distribuição do risco entre os quartis para a definição do ponto de corte

Análise da distribuição dos quartis do escore clínico entre não infectados e infectados

	Não infectado	Infectado	Total	Razão de Prevalência (IC95%)
Quartil 1: 0 pontos	37	12	49	0.89 (0.51-1.54)
Quartil 2: 1 pontos	28	8	36	0.78 (0.39-1.59)
Quartil 3: 2 a 3 pontos	25	13	38	1.43 (0.81-2.53)
Quartil 4: mais de 3 pontos	26	9	35	0.95 (0.48-1.86)
Total	116	42	158	-

Análise de distribuição dos quartis do escore do poder aquisitivo dos proprietários dos cães participantes entre não infectados e infectados

Quartil 1: 0 a 13 pontos	28	6	34	0.58 (0.25-1.30)
Quartil 2: 14 a 16 pontos	26	7	33	0.73 (0.34-1.55)
Quartil 3: 17 a 21 pontos	35	19	54	1.47 (0.95-2.27)
Quartil 4: maiores do que 21 pontos	25	10	35	1.08 (0.57-2.06)
Total	114	42	156	

Arquivo Suplementar III – Extrato de saída do modelo regressivo de Poisson

Modelo Cuidados > biológico > ambiente

```
. glm infectados consultasvetultimoano vacina escorel6, family(poisson) link(log) vce(robust) eform
```

```
Iteration 0: log pseudolikelihood = -94.877446  
Iteration 1: log pseudolikelihood = -92.905513  
Iteration 2: log pseudolikelihood = -92.902845  
Iteration 3: log pseudolikelihood = -92.902844
```

```
Generalized linear models  
Optimization : ML  
Deviance = 101.8056885
```

```
No. of obs = 156  
Residual df = 152  
Scale parameter = 1  
(1/df) Deviance = .6697743
```

Pearson = 116.389053 (1/df) Pearson = .7657175

Variance function: V(u) = u [Poisson]
Link function : g(u) = ln(u) [Log]

Log pseudolikelihood = -92.90284425 AIC = 1.242344
BIC = -665.7724

infectados	IRR	Robust Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
consultasvetultimoano	.4674135	.2399176	-1.48	0.138	.1709189	1.27824
vacina	.5758609	.1617999	-1.96	0.050	.332013	.9988036
escore16	1.849778	.5341052	2.13	0.033	1.050373	3.257584
_cons	.3103603	.0926381	-3.92	0.000	.1728998	.5571058

.
end of do-file

. do "C:\Users\LUCIA-1.SAN\AppData\Local\Temp\STD00000000.tmp"

. glm infectados vacina escore16 usaresse_pelagemcurta usaresse_corpelagem, family(poisson)
link(log) vce(robust) eform

Iteration 0: log pseudolikelihood = -82.114604
Iteration 1: log pseudolikelihood = -80.275014
Iteration 2: log pseudolikelihood = -80.270971
Iteration 3: log pseudolikelihood = -80.27097

Generalized linear models No. of obs = 137
Optimization : ML Residual df = 132
Scale parameter = 1
Deviance = 84.54193962 (1/df) Deviance = .6404692
Pearson = 94.21489583 (1/df) Pearson = .7137492

Variance function: V(u) = u [Poisson]
Link function : g(u) = ln(u) [Log]

Log pseudolikelihood = -80.27096981 AIC = 1.244832
BIC = -564.8955

infectados	IRR	Robust Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
vacina	.5554585	.1598577	-2.04	0.041	.3159954	.9763879
escore16	2.252199	.7273538	2.51	0.012	1.195939	4.241355
usaresse_pelagemcurta	2.494189	1.107064	2.06	0.039	1.045002	5.953078
usaresse_corpelagem	1.545943	.4070029	1.65	0.098	.9227755	2.589945
_cons	.1009694	.0639385	-3.62	0.000	.0291857	.3493091

.
end of do-file

. do "C:\Users\LUCIA-1.SAN\AppData\Local\Temp\STD00000000.tmp"

. glm infectados vacina escore16 usaresse_pelagemcurta quint_mo quint_terraograma
outros_animais, family(poisson) link(log) vce(robust) eform

Iteration 0: log pseudolikelihood = -88.878802
Iteration 1: log pseudolikelihood = -86.421243
Iteration 2: log pseudolikelihood = -86.406095
Iteration 3: log pseudolikelihood = -86.406088

Generalized linear models No. of obs = 152
Optimization : ML Residual df = 145
Scale parameter = 1
Deviance = 88.81217554 (1/df) Deviance = .6124978
Pearson = 99.42108344 (1/df) Pearson = .6856626

Variance function: V(u) = u [Poisson]
Link function : g(u) = ln(u) [Log]

Log pseudolikelihood = -86.40608777 AIC = 1.229027
BIC = -639.6505

infectados	IRR	Robust Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
------------	-----	------------------	---	------	----------------------	--

vacina	.6262655	.1867878	-1.57	0.117	.3490455	1.12366
escore16	2.027373	.5806397	2.47	0.014	1.15651	3.554003
usaresse_pelagemcurta	2.311009	.9600585	2.02	0.044	1.023737	5.216928
quint_mo	1.001515	.2618624	0.01	0.995	.5999247	1.671929
quint_terraograma	4.152008	2.379465	2.48	0.013	1.350346	12.76648
outros_animais	.7680715	.1928163	-1.05	0.293	.4695874	1.256281
_cons	.0452395	.0358702	-3.90	0.000	.0095632	.2140089

5.3 Comunicação curta: Análise espacial dos casos prevalentes de leishmaniose visceral canina utilizando diferentes parâmetros para a definição de caso de infecção.

Ana Izabel Passarella Teixeira, Debora Marcolino Silva, Gustavo Adolfo Sierra Romero

RESUMO

A aplicação de ferramentas de análise espacial para o estudo da leishmaniose visceral canina pode sofrer influência do método de detecção dos cães com leishmaniose em função da grande variedade de testes disponíveis com diferentes características de acurácia. Nesse sentido, apresentamos uma comparação espacial comparando dois critérios de infecção/doença LVC. O primeiro com uma combinação de técnicas parasitológicas, moleculares e sorológicas. O segundo, os testes sorológicos recomendados na rotina pelo Ministério da Saúde. Observou-se que, de fato, o uso de diferentes testes diagnósticos pode ter impacto importante sobre as análises espaciais.

INTRODUÇÃO

A análise espacial tem sido utilizada nos estudos de doenças infecciosas no intuito de se compreender padrões geográficos de morbimortalidade dessas enfermidades, bem como identificar áreas de risco e conseqüentemente potencializar as ações de vigilância epidemiológica (Werneck et al. 2002; Santos & Souza, 2007).

Os conceitos da análise espacial aplicados aos estudos de leishmaniose visceral humana (LVH) e canina permitiram identificar a relação de dependência espacial de casos humanos e caninos, comparar a distribuição geográfica do vetor sobre áreas de maior ocorrência de casos, bem como as áreas de maior morbidade (Oliveira et al. 2001; Werneck et al. 2002; Costa et al 2018).

Entretanto, em estudos de distribuição espacial de casos de leishmaniose visceral canina (LVC) deve haver especial atenção em relação aos critérios para a definição dos casos. Isso porque os resultados podem sofrer influência direta do método utilizado para o diagnóstico dos cães. Ainda não há consenso sobre qual seria o melhor método de diagnóstico da infecção canina, principalmente nos casos de cães assintomáticos, bem como existe uma diversidade de métodos de diagnóstico com ampla variação na sua acurácia (Peixoto et al. 2015; Dias et al. 2018).

Atualmente, o protocolo de diagnóstico de LVC recomendado pelo Ministério da Saúde (Brasil 2011) envolve o uso em série de dois testes sorológicos, o TR-DPP e o EIE-LVC. Porém, esses testes têm sofrido críticas quanto às suas características de acurácia. Por tal motivo o desenvolvimento de novos testes permanece como prioridade relevante na abordagem do problema (Faria & Andrade 2012; Lopes et al. 2017; Carvalho et al. 2018).

Nesse sentido, apresentamos uma comparação espacial aninhado em um estudo transversal desenvolvido com o objetivo de identificar fatores associados à infecção canina que permitiu mostrar diferenças dependendo do critério utilizado para a definição de caso de infecção. O primeiro com uma combinação de técnicas parasitológicas, moleculares e sorológicas e o segundo os testes sorológicos recomendados na rotina pelo Ministério da Saúde.

METODOLOGIA

Realizou-se um estudo descritivo na XXXI região administrativa do Distrito Federal (Fercal), reconhecidamente endêmica para LVC e LVH. (Carranza-Tamayo et al. 2010; Brasil 2013; Carranza-Tamayo et al., 2016).

O estudo foi realizado com base nos resultados de testes para detecção de leishmaniose visceral em cães avaliados em um estudo transversal. Com base nos registros do contingente da população humana, a população canina foi estimada em 342 cães (Bogel et al. 1990; Brasil 2013). E, com base em trabalhos anteriores (Brasil 2013; Silva et al. 2017), a frequência de infecção foi estimada em 10%. E os outros parâmetros utilizados foram margem de erro de 5%, intervalo de confiança de 95%, efeito de desenho 1,5 [correção com base na possibilidade de efeito de conglomerado, conforme orientado por Raggio & Magnanini (2000)], possibilidade de perdas de 10%, o tamanho amostral foi de 160 cães. Todo cálculo da amostragem foi realizado no programa *Stat Calc* do Epi Info, versão 7.2.0.1.

A coleta foi realizada de forma sistemática, de tal forma todo território da Fercal foi percorrido, e coletou-se material dos cães uma casa por quarteirão, sendo que em muitos quarteirões não foi possível coletar, por ausência de cães elegíveis ou por falta de consentimento dos proprietários dos animais. O sangue foi coletado via punção venosa periférica e a medula óssea foi coletada no osso esterno mediante sedação foi feita com quetamina (8 mg/kg) associado a acepromazina (0,1 mg/kg). Os proprietários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e permitiram a coleta de sangue e medula óssea de seus animais. Após o proprietário aceitar a participação do projeto, foi identificado o local da residência por meio de coordenadas com o aplicativo *Locus Map* Versão 2.1.3 (disponível gratuitamente na *Google Play Store*). Todos esses protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade de Brasília sob o número UnBDoc 11253/2015.

As amostras foram submetidas a uma bateria de testes parasitológicos (parasitológico direto corado com Giemsa e cultura), testes sorológicos (TR-DPP, EIE-LVC e ELISA rK39) e testes moleculares (triagem

com PCR com alvo de kDNA e confirmatório com PCR ITS1), conforme protocolos descritos no trabalho de Teixeira et al. (2019).

A partir dos resultados laboratoriais foram estabelecidos dois critérios de definição de caso. O primeiro critério de definição de caso (Critério 1) considerou infectado o cão que mostrou resultado positivo em pelo menos um dos testes diagnósticos realizados considerando: parasitológico direto, cultura, TR-DPP e EIE-LVC de forma sequencial, TR-DPP e ELISA rK 39 de forma sequencial e testes moleculares (triagem com PCR kDNA e confirmatório com PCR ITS1). E, não infectados todos os cães que não apresentaram nenhum resultado positivo em todos os testes descritos acima. O segundo critério de definição de caso (Critério 2) considerou infectado o cão que mostrou resultado positivo de acordo com o protocolo sequencial TR-DPP e EIE-LVC, recomendado pelo Ministério da Saúde. E, não infectados os cães que não apresentaram resultados positivos no protocolo sorológico sequencial descrito acima.

Com a base cartográfica, as imagens disponíveis e os dados coletadas em campo, foram elaborados os mapas com o auxílio do software ArcGIS 10.3.1. A base cartográfica trabalhada e produzida na pesquisa foi processada no sistema de Projeção Universal Transversa de Mercator (UTM), datum SIRGAS 2000, meridiano de referência 51°W (Fuso 23 S).

Para análise da distribuição espacial dos cães, de acordo com os critérios de infecção previamente estabelecidos, as coordenadas marcadas no ponto de coleta com o GPS (Global Positioning System) *Locus Map* Versão 2.1.3 (disponível gratuitamente na *Google Play Store*) foram organizados em uma tabela no software Excel, em que os dados, utilizando cada um dos dois critérios foram atribuídos. Posteriormente importados no software ArcGIS 10.3.1. e, com auxílio da ferramenta *Kernel Density* foi gerado um mapa de densidade para cada um dos critérios. Eles foram realizados direcionados para a área urbana da Fercal, pois a maior é ocupada por uma área de proteção ambiental (APA Cafuringa, para cada um dos grupos).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região de estudo da Fercal e os limites da área de proteção ambiental estão apresentados na Figura 1.

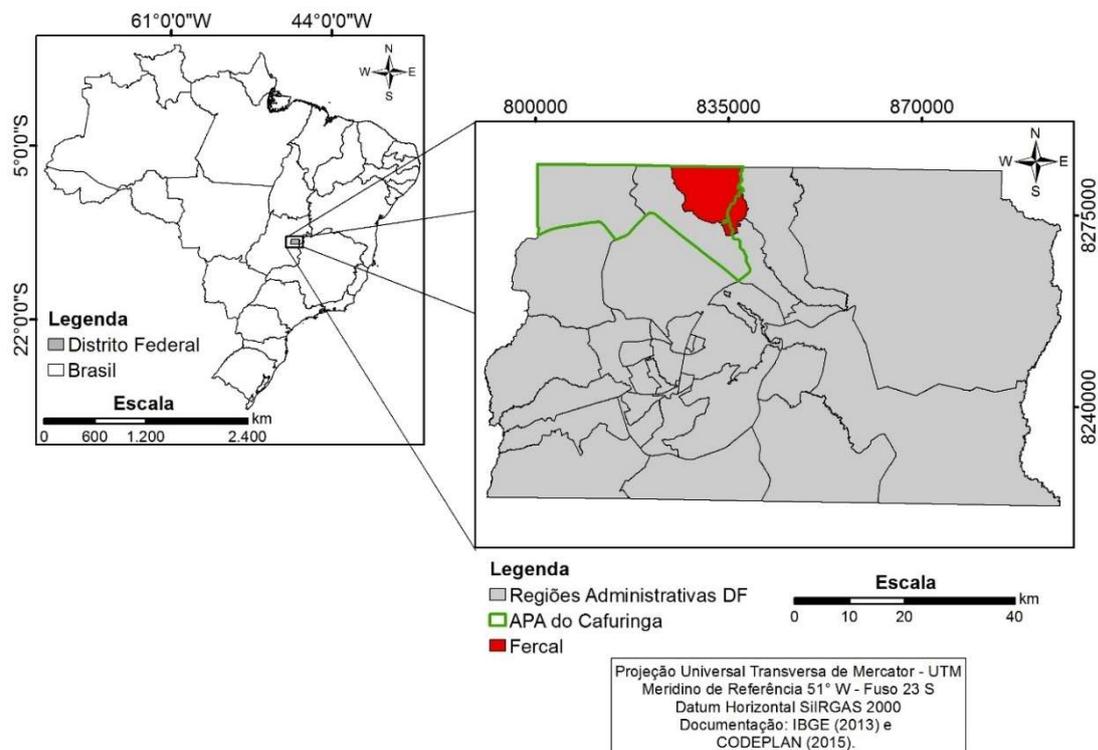


Figura 1 – Localização da Região Administrativa da Fercal, Distrito Federal, Brasil.

A prevalência de cães infectados utilizando o critério 1 foi 26,25% (IC95%: 20,05 a 33,57). E a prevalência de cães infectados utilizando o critério 2 foi 9,38% (IC95% 5,76 a 14,89).

Os mapas com o Kernel dos dois critérios estabelecidos:

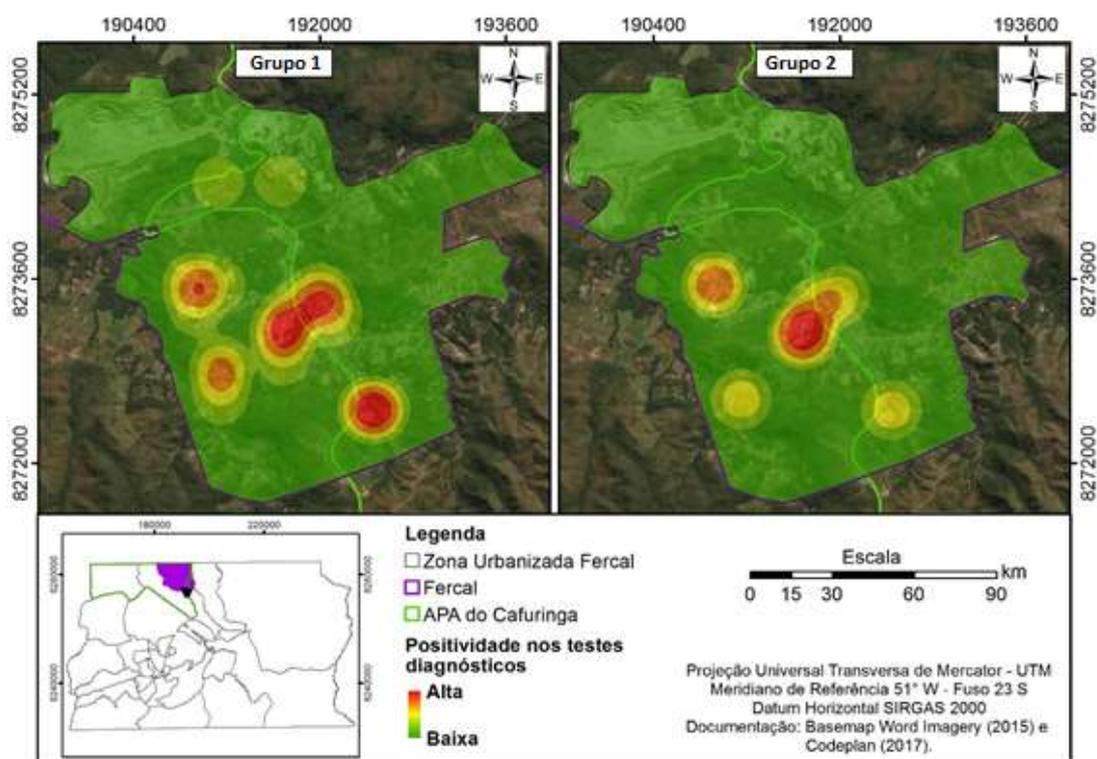


Figura II – Mapas de Kernel com os *hots-spots* de acordo com os dois critérios de detecção de cães com LVC. Distrito Federal, Brasil

O uso de mapas em investigações epidemiológicas pode ser muito relevante na identificação das áreas prioritárias de intervenção no controle de uma doença (Oliveira et al. 2001; Werneck et al. 2002; Costa et al 2018). A presente descrição mostra a diferença existente entre potenciais áreas de interesse para a aplicação de intervenções para o controle da LVC baseadas nos resultados de diferentes abordagens diagnósticas aplicada à população canina. O mapa construído, utilizando o critério de definição de caso recomendado pelo Ministério da Saúde (Grupo 2), traz uma informação que poderia oferecer orientação inadequada aos tomadores de decisão responsáveis pelo programa de controle, caso as imagens fossem utilizadas para decidir em quais localidades deveriam ser aplicadas as intervenções atualmente disponíveis. O mapa que utiliza a definição de caso mais completa (Grupo 1) é capaz de detectar melhor a extensão e intensidade da epidemia, oferecendo melhor informação para a tomada de decisão. Dessa maneira, o presente estudo chama a atenção para a vulnerabilidade que

pode sofrer a análise que incorpora variáveis de localização dos casos de infecção no cenário da LVC, decorrente de dificuldades que transcendem o método de análise espacial e se remontam à ausência de métodos adequados para a detecção acurada da infecção canina. (Peixoto et al. 2015; Borja et al. 2016; Lopes et al. 2017; Teixeira et al. 2019). Conclui-se que o uso de testes diagnósticos diferentes pode ter impacto importante sobre os dados de distribuição espacial dos casos de LVC e que a análise comparativa entre diversos estudos que abordam parâmetros espaciais em relação a esse agravo, devem levar em consideração as técnicas diagnósticas utilizadas. Também, é de especial relevância a consideração sobre os aspectos diagnósticos quando são comparados mapas temáticos de séries temporais que frequentemente apresentam variações nos critérios diagnósticos para a definição dos casos de infecção canina ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS

Barbosa DS, Belo VS, Rangel MES, Werneck GL: Spatial analysis for identification of priority areas for surveillance and control in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. *Acta Trop* 2014; 131:56–62.

Borja LS, Sousa OMF, Solcà MS, Bastos LA, Bordoni M, Magalhães JT, et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Vet Parasitol*. 2016;229(10):110–7.

Costa DNCC, Blangiardo M, Aparecida L, et al. Canine visceral leishmaniasis in Araçatuba, state of São Paulo, Brazil, and its relationship with characteristics of dogs and their owners: a cross-sectional and spatial analysis using a geostatistical approach. *BMC Vet Res*. 2018;14(229):1–13.

Lopes EG, Sevá AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. *Epidemiol Infect* 2017; 145(12):2436-2444.

Peixoto HM, Oliveira MRF, Romero GAS. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis *Trop Med Int Health*. 2015; 20(3):334–52.

Santos SM, Souza WV. Introdução à estatística espacial para a saúde pública. Brasília: Ministério da Saúde/Fundação Oswaldo Cruz; 2007. (Série Capacitação e Atualização em Geoprocessamento em Saúde)

Teixeira AIP, Silva DM, Vital T, Nitz N, et al. Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018; 114: e180452.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho destacam a necessidade de abordar os gargalos que tem impedido a completa compreensão do papel do cão infectado assintomático na manutenção da transmissão da leishmaniose visceral canina (LVC) e os seus consequentes riscos para a saúde humana.

Dessa forma, os dados obtidos no estudo de validação de um novo teste diagnóstico e os resultados de uma nova abordagem que abrange as características dos tutores dos animais, como potenciais determinantes do risco de infecção, podem sugerir novos caminhos para resolver os desafios enfrentados pelo programa de controle da doença. O papel dos cães infectados assintomáticos tem sido motivo de controvérsia em relação à parcela de responsabilidade que lhes cabe na transmissão e tem autores que acreditam que os animais assintomáticos não teriam maior relevância no processo, quando comparados com cães sintomáticos, que com a sua maior carga parasitária, atuariam como “*super spreaders*” (Duthie et al. 2018). No entanto, o papel dos animais assintomáticos infectados ainda deve ser estudado com maior profundidade, pois tendo em vista o seu número proporcionalmente maior nas áreas onde ocorre a transmissão, existiria a possibilidade de que constituíssem fator chave para a perpetuação da endemia, portanto, cruciais para o seu controle.

Assim, em uma região endêmica, existem mais cães infectados assintomáticos do que sintomáticos. No presente trabalho a prevalência de infecção foi 26,25% (IC95%: 20,05 a 33,57), substancialmente distinta da

prevalência da doença 13,75% (IC95%: 9,26 a 19,94). Outros trabalhos também identificaram esse fato de que em uma população existem mais cães assintomáticos do que sintomáticos (Quinnell et al. 2013; Esteva et al. 2017; Lopes et al. 2017; Zou et al. 2017).

Além disso, apesar de os cães assintomáticos transmitirem o parasito ao vetor em uma taxa menor do que os animais sintomáticos (Laurenti et al. 2013; Courtenay et al. 2014), a longa permanência dos primeiros no ambiente, como animais clinicamente saudáveis, ofereceria maior oportunidade de serem picados pelos vetores promovendo a transmissão. O grande problema em relação aos animais assintomáticos é estimar o seu número real. Sem esta informação, os modelos matemáticos que pretendem prever o impacto das medidas de controle tornam-se de difícil interpretação, pois a magnitude da infecção, geralmente estimada por meio da soroprevalência canina, pode ter sido subestimada nos estudos disponíveis. Isto porque os cães assintomáticos são de mais difícil detecção, seja pela baixa carga parasitária ou baixos níveis de anticorpos séricos, seja pela falta de acurácia dos testes atualmente em uso na rotina do programa de controle. No estudo já publicado (Teixeira et al 2019), com efeito, observou-se a baixa acurácia dos testes diagnósticos que se tornou evidente graças ao uso de um padrão de referência aprimorado pela combinação de vários métodos. Utilizando-se os dados do presente estudo, a estimativa da prevalência de infecção, quando aplicados os métodos de diagnóstico atualmente preconizados, seria de 9,38% (IC95% 5,76 a 14,89), valor muito aquém do obtido utilizando um maior número e diversidade de exames de diagnóstico. Por mais que isso seja uma obviedade, é preciso ressaltar que, quando não identificados, esses animais infectados não podem ser alvo de intervenção alguma.

Os dados georreferenciados da ocorrência de cães infectados utilizando diversos critérios de diagnóstico mostra de forma mais ou menos eloquente a relevância de definir melhor os parâmetros para classificar/identificar os animais infectados. Dependendo dos parâmetros de definição de caso de infecção utilizados para fins de controle da zoonose, o

esforço de planejamento pode variar de forma importante, principalmente quando se planejam medidas que abrangem seletivamente os cães infectados. Por outro lado, a aplicação de medidas não seletivas, basicamente enfrenta o desafio de estimar a população canina em risco, tal como quando se pretende utilizar encoleiramento em massa com dispositivos impregnados com deltametrina.

Toda essa problemática do cão assintomático tem um paralelo interessante com a infecção assintomática em humanos. Em seres humanos a infecção assintomática também é de difícil detecção, em razão da baixa carga parasitária, baixos títulos de anticorpos e inadequação de testes para esse cenário. De fato, nenhum dos testes disponíveis foi desenvolvido para detectar a infecção assintomática, seja em cães ou humanos. Apesar dessa limitação, a detecção de casos de infecção assintomática em humanos tem sido utilizada em alguns estudos para se verificar a efetividade das políticas públicas de controle da leishmaniose visceral, pois auxiliariam para estimar a força da transmissão do parasito nas comunidades afetadas (Rocha et al. 2018).

Outro ponto levantado pelos resultados do presente trabalho que merece especial atenção é a importância do proprietário do animal nessa problemática. O proprietário do cão tem potencial para controlar os aspectos da vida do animal, tais como condições de moradia, tipo de alimentação, cuidados básicos, entre outros. Nesse sentido, o resultado aparentemente paradoxal, aqui encontrado, de que melhores condições socioeconômicas poderiam predispor os cães à infecção por leishmaniose visceral (RP = 2,027 - IC95% 1,156 a 3,554) exige o levantamento de algumas hipóteses que possam explicar esta observação. Uma explicação possível seria de que cães que recebem cuidados que produziram melhores condições de saúde, tais como uma melhor alimentação, prevenção de outras doenças infecciosas que levam ao óbito em fases precoces da vida dos animais, poderia ter maior probabilidade de sobreviver e serem expostos ao risco de adquirir leishmaniose visceral. Ao mesmo tempo, a sua melhor condição nutricional permitiria uma sobrevivência mais prolongada mesmo que infectados

por *Leishmania*. Alternativamente, outros fatores de natureza genética podem estar envolvidos e afetariam cães de raça versus cães sem raça definida que poderiam apresentar vigor híbrido que os protegeria contra a infecção (Vasconcelos et al. 2017). Finalmente, a recusa a entregar os animais infectados para eutanásia poderia também ser um fator que aumentasse a prevalência de animais infectados seletivamente na população de tutores com melhores condições socioeconômicas, tanto que antes da liberação do medicamento milteforan para o tratamento dos cães, havia muitos processos na justiça, solicitando autorização para o tratamento específico em contraposição à eutanásia (Marcondes e Day 2019). É interessante ressaltar que as técnicas de diagnóstico utilizadas nos estudos aqui apresentados, que permitiram essa detecção mais acurada e precisa da quantidade de cães infectados assintomáticos, não teriam viabilidade operacional em um inquérito epidemiológico conduzido em uma população maior e de maneira rotineira. Portanto, verifica-se a urgência de desenvolver novos testes de diagnóstico que apresentem maior sensibilidade para tal finalidade. Independentemente do valor do diagnóstico individual de cada cão que reveste especial importância na clínica veterinária, em termos de saúde pública seria necessário um teste ou a combinação de vários testes com acurácia elevada, de fácil aplicação - inclusive em condições de campo - e de baixo custo para uso nos inquéritos caninos que constituem elemento essencial na aferição de impacto das medidas de controle.

Não é apenas no âmbito dos cuidados diretamente aplicados ao animal que a influência do proprietário pode ser relevante. O estudo permitiu demonstrar que residências com quintal com cobertura vegetal ou presença de terra aumentariam o risco de infecção (RP de 4,153; IC95% 1,351 a 12,766). Esse resultado, em conjunto com outros que demonstraram a influência ambiental (Figueiredo et al. 2017; Abrantes et al. 2018), poderia abrir espaço para o desenvolvimento de medidas de manejo direcionadas ao peridomicílio que poderiam ter maior aceitabilidade pela população, sendo evidente que seria inviável e indesejável impermeabilizar o solo em 100% dos quintais de residências em uma região endêmica.

Finalmente, tendo em vista as limitações metodológicas inerentes a um estudo transversal, recomenda-se que sejam realizados estudos de coorte que permitam explorar a associação dos fatores vinculados aos tutores dos animais como determinantes do risco de infecção ao longo do tempo. Isso é importante para se verificar a consistência das observações realizadas no presente estudo.

7.CONCLUSÕES

1. A sensibilidade do teste DAT-*Canis* é baixa e a sua acurácia é semelhante à dos testes sorológicos atualmente disponíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.
2. As diversas combinações de testes diagnósticos – com os testes TR-DPP, EIE-LVC, DAT-*Canis* e ELISA rK39 – não produziram melhoria relevante na acurácia diagnóstica da LVC.
3. O uso de um padrão de referência aprimorado, incluindo técnicas de diagnóstico molecular, permitiu identificar que o maior problema dos testes de diagnóstico disponíveis e do teste DAT-*Canis* é a baixa sensibilidade.
4. A prevalência de infecção LVC na Fercal foi 26,25% (IC95%: 20,05 a 33,57) enquanto a prevalência de doença foi 13,75% (IC95%: 9,26 a 19,94).
5. Os fatores associados, independentemente, ao risco de infecção canina são a pelagem curta RP = 2,331 (IC95%: 1,023 a 5,216), presença de quintal com predominância de terra e/ou vegetação RP = 4,153 (IC95%: 1,351 a 12,766), e maior status socioeconômico RP = 2,027 (IC95%: 1,156-3,554).

REFERÊNCIAS

Abbehusen MMC, Almeida VA, Solcà MS, Pereira LS, Costa DJ, Gil-Santana L, et al. Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. *Sci Rep*. 2017;7(1):15914. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-15651-8>

ABEP. 2012. Alterações na aplicação do Critério Brasil. São Paulo: Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa. <http://www.abep.org/Servicos/Download.aspx?id=03> Acessado em 2 de Fevereiro de 2014

Abrantes TR, Madeira MF, Silva DA, Perié CSFS, Mendez-Junior AA, Menezes RC, et al. Identification of canine visceral leishmaniasis in a previously unaffected area by conventional diagnostic techniques and cell-block fixation. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 2016;58:3.

Abrantes TR, Werneck GL, Almeida AS, Figueiredo FB, Brazil environmental factors associated with canine visceral leishmaniasis in an area with recent introduction. *Cad Saude Pub*. 2018. 34(1): 1–12.

Akhound M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Neg Trop Dis*. 2016; 10 (3): e0004349.

Almeida BFM, Silva KLO, Chiku VM, Leal AAC, Venturin GL, Narciso LG, et al. The effects of increased heme oxygenase-1 on the lymphoproliferative response in dogs with visceral leishmaniasis. *Immunobiol*. 2017;222(5):693-703.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e35671.

Araújo VEM, Pinheiro LC, Almeida MC de M, de Menezes FC, Morais MHF, Reis IA, et al. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(11): e2540.

Arruda MM, Figueiredo FB, Cardoso FA, Brazuna M, Regina M, Oliveira F. Validity and reliability of enzyme immunoassays using *Leishmania major* or *L. infantum* antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS ONE*; 2013;8(7): e69988.

Arruda MM, Figueiredo FB, Marcelino AP, Barbosa JR, Werneck GL, Noronha EF, et al. Sensitivity and specificity of parallel or serial serological testing for detection of canine *Leishmania* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111(3):168–73.

Ayala I, Bernal LJ, Garcia-martinez JD, Angel M, Navarro JA, Bernabe A. An atypical case of leishmaniasis associated with chronic duodenitis in a dog. JAAHA 2017; 53(2):101–6.

Banoo S, Bell D, Bossuyt P, Herring A, Mabey D, Poole F, et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: General principles. Nat Rev Microbiol. 2010;8(12):S17–29.

Barata RA, Peixoto JC, Tanure A, Gomes ME, Apolinário EC, Bodevan EC, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. Biomed Res Int. 2013; 405083.

Barbosa IR. Human visceral leishmaniasis in epidemiological and spatial analysis. Ciência Plur. 2016;2(1):89–101.

Belo VS, Struchiner CJ, Werneck GL, Barbosa DS, de Oliveira RB, Neto RGT, et al. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. Vet Parasitol. 2013;195(1–2):1–13.

Berry I, Berrang-Ford L. Leishmaniasis, conflict, and political terror: A spatio-temporal analysis. Soc Sci Med. 2016; 167:140-9.

Bezerra JMT, Araújo VEM, Barbosa DS, Martins-Melo FR, Werneck GL, Carneiro M. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. Plos Negl Trop Dis. 2018;12(9): e0006697.

Bio-Manguinhos. EIE - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA [Internet]. Rio de Janeiro, Brasil: Bio-Manguinhos/FIO-CRUZ; 2014. Available from: [http://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/manuais/leishmaniose/BM_014_08Bk_EIEleish can.pdf](http://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/manuais/leishmaniose/BM_014_08Bk_EIEleish_can.pdf)

Boelaert M, Bhattacharya S, Chappuis F, El Safi S, Mondal D, Rijal S. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. Nat Rev Microbiol 2007; 5: S30–S39. doi: 10.1038/nrmicro1766.

Borja LS, Coelho LB, Jesus MS, Queiroz ATL, Celedon PAF. High accuracy of an ELISA test based in a flagella antigen of *Leishmania* in serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis with potential to improve the control measures in Brazil – A Phase II study. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(10):e0006871.

Borja LS, Sousa OMF, Solcà MS, Bastos LA, Bordoni M, Magalhães JT, et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. Vet Parasitol. 2016;229(10):110–7.

Brasil. Portaria Interministerial nº 1777 Portaria; 2008. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.htm Acesso em 12 dezembro 2018.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. 120p.: il. Color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerar_1edicao.pdf Acesso 8 de março 2014.

Brasil. Lei Orgânica do Distrito Federal. Brasil; 1993 p. 1–134. Disponível em: https://www2.senado.leg.br/bdsf/bitstream/handle/id/70442/LO_DistritoFederal.pdf?sequence=1 Acesso em 12 Dez 2018.

Brasil. 2000 Organograma da Subsecretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Subsecretaria de Vigilância em Saúde; 2000. Disponível em: http://www.saude.df.gov.br/wpconteudo/uploads/2018/02/f_SVS_10_ALTER_ACAO.pdf Acesso em 12 dezembro 2018.

Brasil. Lei 11794 de 8 de Outubro de 2008 [Internet]. Brasil; 2008. Available from: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose Visceral: Recomendações Clínicas para Redução da Letalidade. 1ª.Ed. Ministério da Saúde, Brasília 2011 Disponível em: http://sbmt.org.br/portal/wpcontent/uploads/2013/01/lv_reducao_letalidade_web.pdf Acesso em 10 dezembro 2018.

Brasil, MS/SVS/DVIT - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Nota Técnica Conjunta 01/2011. Brasília: CGDT/CGLAB/DVIT/ SVS/MS; 2011

Brasil, DIVAL/GEVAZ/GDF 2013. Informativo Ambiental Das Leishmanioses No DF. Brasília. Disponível em: http://www.saude.df.gov.br/images/Informativos/DIVAL/Informativo_AmbientaI_2013_Leishmanioses_EM_PDF.pdf Acesso 12 de março 2014.

Brasil. CODEPLAN/GDF. Pesquisa Distrital por Amostra de Domicílios PDAD Fercal 2013. Disponível em:

http://www.codeplan.df.gov.br/images/CODEPLAN/PDF/pesquisa_socioeconomica/pdad/2013/PDAD_Fercal_-_2013.pdf Acesso em 15 de março de 2015.

Brasil. CODEPLAN/GDF. Pesquisa Distrital por Amostra de Domicílios PDAD Fercal 2015. Disponível em: http://www.codeplan.df.gov.br/images/CODEPLAN/PDF/pesquisa_socioeconomica/pdad/2016/PDAD_Fercal_2015.pdf Acesso em 12 de dezembro de 2018.

Brasil. Nota Técnica No 11/2016/Cpv/Dfip/Sda/Gm/Mapa Brasil; 2016 p. 19–20. Disponível em: <http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf> Acesso 12 Dez 2018 Acesso em 12 de dezembro de 2018.

Bögel K, Frucht K, Drysdale G, Remfry J, World Health Organization. Veterinary Public Health Unit. et al. (1990). Guidelines for dog population management / preparation; editing co-ordinated by Frucht K, Drysdale G and Remfry J Geneva: World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/61417> Acesso em 03 fevereiro de 2014.

Bruno B, Romano A, Zanatta R, Spina S, Mignone W, Ingravalle F, et al. Serum indirect immunofluorescence assay and real-time PCR results in dogs affected by *Leishmania infantum*: evaluation before and after treatment at different clinical stages. J Vet Diagn Invest. 2019; 13: 1040638718824140 doi: 10.1177/1040638718824140.

Bsrat A, Berhe M, Gadissa E, Taddede H, Tekle Y, Hagos Y, et al. Serological investigation of visceral *Leishmania infection* in human and its associated risk factors in Welkait District, Western Tigray, Ethiopia. Parasite Epidemiol Control. 2018;3(1):13–20.

Campos MP, Luca PM, Renzetti ARS, Souza SMM, Júnior AAVM, Barros RS, et al. Can vaccines against canine visceral leishmaniasis interfere with the serological diagnostics recommended by the Brazilian Ministry of Health? Cienc Rural. 2017;47(4):1–6.

Campos R, Santos M, Tunon G, Cunha L, Magalhães L, Moraes J, et al. Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. Geospat Health. 2017;12:503.

Carranza-Tamayo CO, Carvalho MS, Bredt A, Bofil MI, Rodrigues RM, Silva AD, et al. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(4):396–9.

Carranza-Tamayo CO, Werneck GL, Romero GAS. Are opossums a relevant factor associated with asymptomatic *Leishmania* infection in the outskirts of the largest Brazilian cities? *Brazilian J Infect*. 2016;20(2):119–26.

Castro-Júnior JG, Freire ML, Campos SPS, Scopel KKG, Porrozzi R, Silva ED, et al. Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais state, Brazil, based on immunochromatographic dual-path platform and pcr assays. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014;56(3):225–9.

Ceron JJ, Caldin M, Furlanello T, Tecles F, Bernal L, Baneth G. Use of acute phase proteins for the clinical assessment and management of canine leishmaniasis : general recommendations. *BMC Vet Res*. 2018;14(196):1–5.

Chagas RL. Leishmaniose Visceral Canina: Perfil Epidemiológico do Distrito Federal de 2013 a 2017 [Internet]. Universidade de Brasília; 2017. Disponível em <http://bdm.unb.br/handle/10483/17981>

Constantino C, Pasquali AKS, Caldart ET, Ferreira FP, Marana ERM, Freire RL, et al. Seroepidemiology of *Leishmania spp.* in dogs residing in Telêmaco Borba, Paraná, Brazil. *Semin Agrar*. 2014;35(6):3181–90.

Cordeiro TAR, Gonçalves MVC, Franco DL, Reis AB, Martins HR, Ferreira LF. Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Talanta* 2019;195:327–32.

Costa DNCC, Codeço CT, Silva MA, Werneck GL. Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(8):e2355.

Costa GRT, Cruz LM, Francisco AK, Coelho TO, Santos IB. Atuação da Vigilância Ambiental em saúde no controle da leishmaniose visceral em condomínio horizontal na Região Administrativa Jardim Botânico, Distrito Federal. *Com Ciências Saúde* 2016;27(2):167–72.

Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Leal GGDA, Moreira NDD, et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *PLoS One*. 2014;9(3):1–6.

Coura-Vital W, Leal GGA, Marques LA, Pinheiro AC, Carneiro M, Reis AB. Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: A large scale intervention study in an endemic area. *PLoS One*. 2018; 13(12):e0208613.

Coura-Vital W, Reis AB, Fausto MA, Leal GGA, Marques MJ, Veloso VM, Carneiro M. RISK Factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from an endemic area of Brazil. PLoS One. 2013; 8 (8): e71833.

Courtenay O, Carson C, Calvo-Bado L, Garcez R, Quinnell JR. Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8 (1): e2583.

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. J Infect Dis 2002;186(9):1314–20.

Cruz LMO, Retrato da Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal, Brasília. 2013. Trabalho de Pós-Graduação (Especialização em Vigilância Sanitária) – IBE – Instituto Brasileiro de Educação, Brasília.

D'Andrea LAZ, Silva FE, Prestes-Carneiro LE, Guimarães RB, Yamashita RC, Soares CN, et al. The shadows of a ghost: a survey of canine leishmaniasis in Presidente Prudente and its spatial dispersion in the western region of São Paulo state, an emerging focus of visceral leishmaniasis in Brazil. BMC Vet Res 2015;11(1):273.

Daneshvar H, Mahmmodi Z, Kamiabi H, Phillips RS, Burchmore R. Dogs vaccinated with gentamicin-attenuated *Leishmania infantum* or infected with wild-type parasite can be distinguished by Western blotting. Parasite Immunol. 2014;36(5):218–24.

Dantas-Torres F, Miró G, Bowman DD, Gradoni L, Otranto D. Culling dogs for zoonotic visceral leishmaniasis control: the wind of change. Trends Parasitol 2019;35(2):97–101.

Duthie MS, Lison A, Courtenay O. Advances toward Diagnostic Tools for Managing Zoonotic Visceral Leishmaniasis. Trends Parasitol. 2018;34(10):881–90.

Esteva L, Vargas C, Vargas-de-León C. The role of asymptomatics and dogs on leishmaniasis propagation. Math Biosci. 2017; 293:46–55.

Farahmand M, Nahrevanian H. Application of recombinant proteins for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in humans and dogs. Iran Biomed J. 2016;20(3):128–34.

Farca AM, Miniscalco B, Badino P, Odore R, Monticelli P, Trisciuglio A, et al. Canine leishmaniasis: *In vitro* efficacy of miltefosine and marbofloxacin

alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. Parasitol Res. 2012;110(6):2509–13.

Faria AR, Andrade HM. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. Rev Pan-Amaz. Saúde. 2012;3(2):47–57.

Faria AR, Pires SF, Reis AB, Coura-Vital W, Silveira JAG, Sousa GM, et al. Canine visceral leishmaniasis follow-up: a new anti-IgG serological test more sensitive than ITS-1 conventional PCR. Vet Parasitol. 2017;248(10):62–7.

Felipe K, Costa DL, Santos S, Amóra A, Fernandes C, Couto DA, et al. Awareness of visceral leishmaniasis and its relationship to canine infection in riverside endemic areas in Northeastern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2014;47(10):607–12.

Figueiredo ABF, Werneck GL, Cruz M do SP e, Silva JP da, Almeida AS de. Uso e cobertura do solo e prevalência de leishmaniose visceral canina em Teresina, Piauí, Brasil: uma abordagem utilizando sensoriamento remoto orbital. Cad Saude Publica 2017;33(10):1–13.

Figueiredo FB, Vasconcelos TCB, Madeira M de F, Menezes RC, Maia-Elkhoury ANS, Marcelino AP, et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018; 113(11):e180260.

Figueiredo MJFM, Souza NF, Figueiredo HF, Meneses AMC, Filho EDS, Nascimento GG. Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. Cienc Anim Bras. 2014;15(1):102–6.

Furtado MC, Menezes RC, Kiupel M, Madeira MF, Oliveira RVC, Langohr IM, et al. Comparative study of in situ hybridization, immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniosis. Parasit Vectors 2015;8:620.

Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotallevi A, Menotta M, Magnani M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. Parasit Vectors. 2018;11(273):1–13.

Galvis-ovallos F, Dantas M, Baldaconi G, Oliveira AG De, Rodriguez J, Neto G, et al. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. Parasite. 2017;24(2)2-9

Geraldo L, Júnior C, Wanderley ADP, Lemes MS, Cristina B, Leite R, et al. Leishmaniose visceral infantil: relato de caso infantil. 2016;95(3):133–7.

Gharbi M, Mhadhbi M, Rejeb A, Jaouadi K, Rouatbi M, Darghouth MA. Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. Rev Sci Tech. 2015;34(2):613–26.

Gomez SA, Curdi JL, Hernandez JAC, Peris PP, Gil AE, Velasquez RVO, et al. Phlebotomine mortality effect of systemic insecticides administered to dogs. Parasites & Vectors. 2018;11(1):1–9.

Gomez SA, Picado A. Systemic insecticides used in dogs: potential candidates for phlebotomine vector control? Trop Med Int Health 2017;22(6):755-764.

Gouvêa MV, Mendonça IL, Cruz M do SPE, Costa CHN, Braga JU, Werneck GL. Predictive factors for *Leishmania infantum* infection in dogs examined at a veterinary teaching hospital in Teresina, State of Piauí, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2016;49(1):107–11.

Gradoni L. Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. Vet Parasitol 2015;208(1–2):94–100.

Herricks JR, Hotez PJ, Wanga V, Coffeng LE, Haagsma JA, Basáñez MG, et al. The global burden of disease study 2013: What does it mean for the NTDs? PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(8):1–21.

Jain, N.C., 1986. Schalm's Veterinary Hematology, 4th Ed. Lea & Febiger, Philadelphia.

Kaur G, Rajput B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin b, and pentamidine resistance in *Leishmania*. J Parasitol Res. 2014;2014.

Kazimoto TA, Amora SSA, Figueiredo FB, Magalhães JM, Freitas, YABN et al. Impact of 4% deltamethrin-impregnated dog collars on the prevalence and incidence of canine visceral leishmaniasis. Vector Borne Zoonotic Dis. 2018; 18(7): 356-363.

Koutinas AF, Koutinas CK. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. Vet Pathol. 2014;51(2):527–38.

Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. Rev Pan-Amaz Saude. 2010;1(2):13–32.

Laranjeira DF, Matta VLR Da, Tomokane TY, Marcondes M, Corbet CEP, Laurenti MD. Serological and infection statuses of dogs from a visceral leishmaniasis-endemic area. *Rev Saude Publica*. 2014;48(4):563–71.

Larson M, Toepp A, Scott B, Kurtz M, Fowler H. Semi-quantitative measurement of asymptomatic *L. infantum* infection and symptomatic visceral leishmaniasis in dogs using Dual-Path Platform CVL. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016; 101(1):381-390. doi: 10.1007/s00253-016-7925-6

Laurenti MD. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. *BEPA Bol Epidemiológico Paul* 2009;6(67):13–23.

Laurenti MD, Rossi CN, Matta VLR DA, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol*. 2013; 196(3–4):296–300.

Laurenti MD, Santana LMV, Tomokane TY, Lucca HRL, Aschar M, Souza CSF. Comparative evaluation of the DPP CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2014; 205(3–4):444–50.

Leal GGA, Carneiro M, Pinheiro AC, Marques LA, Ker HG, Reis AB. Risk profile for *Leishmania* infection in dogs coming from an area of visceral leishmaniasis reemergence. *Prev Vet Med*. 2018; 150:1–7.

Liévin-Le MV, Loiseau PM. *Leishmania* hijacking of the macrophage intracellular compartments. *FEBS J*. 2016;283(4):598–607.

Lipoldová M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet*. 2006;7(4):294–305.

Lopes EG, Geraldo Junior CA, Marcili A, Silva RD, Keid LB, Oliveira TMF da S, et al. Performance of conventional pcrs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of leishmania spp. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2016;58(1).

Lopes EG, Sevá AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. *Epidemiol Infect*. 2017; 145(12):2436-2444.

Lopes PM, Gasparetto ND, Oliveira CM. Short Communication: Seroprevalence and risk factors associated with visceral leishmaniasis in dogs in Jaciara, State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(6):791–5.

Luiz RR, Magnanini MMF. A lógica da determinação do tamanho da amostra em investigações epidemiológicas. *Cad Saude Coletiva*. 2000;8(2):9–28.

Machado CJS, Silva EG, Vilani RM. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. *Saúde e Soc*. 2016;25(1):247–58.

Maia-Elkhoury ANS, Alves W, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna E. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica*. 2008;24(12):2941–7.

Manzillo VF, Muccio T Di, Cappiello S, Scalone A, Papparcone R, Fiorentino E, et al. Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naive dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *PLoS Neg Trop Dis* 2013;7(5):1–8.

Marcondes M, Day MJ. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Res Vet Sci*. 2019;123:261-272.

Maria A, Carvalho RS, Costa LE, Salles BCS, Santos TTO, Ramos FF, et al. An ELISA immunoassay employing a conserved *Leishmania* hypothetical protein for the serodiagnosis of visceral and tegumentary leishmaniasis in dogs and humans. *Cell Immunol* 2017;318:42-48.

Marques NC, Moreira PRR, Bertolo PHL, Gava FN, Vasconcelos RO. Immunodetection of hepatic stellate cells in dogs with visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*. 2018;117(6):1829-1837

Márquez M, Pedregosa JR, López J, Marco-salazar P, Fondevila D, Pumarola M. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. *J Vet Diagn Invest*. 2013;25(1):142-6

Mello CX, Figueiredo FB, Júnior AAVM, Furtado MC, Miranda LFC, Madeira M de F. Outbreak of canine visceral leishmaniasis in barra mansa, state of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(6):788–90.

Melo GD, Grano FG, Silva JES, Kremer BE, Lima VMF, Machado GF. Blood-brain barrier disruption during spontaneous canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2015;37(12):635–45.

Mendes RS, Oliveira LM, Santana VL, Tafuri WL, Souza AP. Miocardite crônica em um cão naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*: aspectos clínicos e patológicos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2014;(66)1:79–84.

Mendonça IL de, Batista JF, Schallig H, Cruz M do SP, Alonso DP, Ribolla PEM. The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. J São Paulo Inst Trop Med. 2017;59(e39):1–10.

Menon SS, Rossi R, Nshimyumukiza L, Zinszer K. Decentralized control of human visceral leishmaniasis in endemic urban areas of Brazil: a literature review. Trop Med Int Health. 2016;44:9.

Monteiro TNM, Agostini MAP, Bigeli JG, Noletto RV. Molecular and parasitological detection of *Leishmania spp.* in dogs caught in Palmas, TO, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2012;21(3):278–82.

Moreira ED, Souza VMM, Sreenivasan M, Lopes NL, Barreto RB, Carvalho LP. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2003;69(4):393–7.

Nogueira FS, Avino VC, Galvis-Ovallos F, et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. Parasites & Vectors 2019; 12(79): 1-11.

Noli C, Saridomichelakis MN. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). Vet J 2014;202(3):425–35.

Nunes CM, Lima VMF, Paula HB, Perri SHV, Andrade AM, Dias FEF, et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. Vet Parasitol. 2008;153(1–2):19–23.

Oliveira C, Boechat VC, Augusto A, Mendes V, Campos MP, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: parasite load, viability, co-infections and histological alterations. PLoS One. 2017;18;12(4)e0175588.

Oliveira E, Saliba JW, Oliveira D, Santos DE, PAZ GF. A prototype of the direct agglutination test kit (DAT-Canis) for the serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol. 2016; 221:9–13.

Oliveira GG, Santoro F, Sadigursky M. Oliveira, The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1993; 88(2):243-48.

Oryan A, Akbari M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. Asian Pac J Trop Med 2016;9(10):925–32.

Otranto D, Caprariis D, Lia RP, Tarallo V, Lorusso V, Testini G, et al. Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: A longitudinal field study. *Vet Parasitol.* 2010;172(3–4):323–32.

Otranto D, Dantas-Torres F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol.* 2013;29(7):339–45.

Otranto D, Dantas-Torres F, Caprariis D, Di Paola G, Tarallo VD, Latrofa MS, et al. Prevention of Canine Leishmaniasis in a Hyper-Endemic Area Using a Combination of 10% Imidacloprid/4.5% Flumethrin. *PLoS One.* 2013;8(2).

Otranto D, Paradies P, Lia RP, Latrofa MS, Testini G, Cantacessi C, et al. Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Vet Parasitol.* 2007;144(3–4):270–8.

Paiva-Cavalcanti M, Morais RCS, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, Gonçalves-de-Albuquerque SC, Tavares DHC, et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci* 2015;5(1):31.

Paltrinieri S, Mangiagalli G, Ibba F. Use of urinary γ -glutamyl transferase (GGT) to monitor the pattern of proteinuria in dogs with leishmaniasis treated with N-methylglucamine antimoniate. *Res Vet Sci.* 2018;8(119):52-55.

Papadogiannakis EI, Koutinas AF. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015;163(3–4):94–102.

Paz GF, Rugani JMN, Marcelino AP, Gontijo CMF. Implications of the use of serological and molecular methods to detect infection by *Leishmania* spp. in urban pet dogs. *Acta Trop.* 2018;(6)182: 198-201.

Peixoto HM, Oliveira MRF, Romero GAS. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis *Trop Med Int Health.* 2015; 20(3):334–52.

Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BAS, Moreira OC, et al. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors* 2012;5(15): 1-9.

Proboste T, Kalema-Zikusoka G, Altet L, Solano-Gallego L, Fernández de Mera IG, Chirife AD, et al. Infection and exposure to vector-borne pathogens in rural dogs and their ticks, Uganda. *Parasit Vectors* 2015;8:306.

Proverbio D, Spada E, Giorgi GB, Perego R, Valena E. Relationship between leishmania IFAT titer and clinicopathological manifestations (clinical score) in dogs. *Biomed Res Int.* 2014; ID 412808.

Quinnell RJ, Carson C, Reithinger R, Garcez LM, Courtenay O. Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(1):e1992.

Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitol.* 2009;136(14):1915–34.

Rampazzo RCP, Solcà MS, Santos LCS, Pereira LN, Guedes JCO, Veras PST, et al. A ready-to-use duplex qPCR to detect *Leishmania infantum* DNA in naturally infected dogs. *Vet Parasitol.* 2017;246(10):100–7.

Regina-Silva S, Feres AMLT, França-Silva JC, Dias ES, et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vaccine.* 2016;34(19):2233–9.

Reguera RM, Morán M, érez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaña-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2016; 227:98–114.

Ribeiro K, Rosa V, Mendonça R, Silva KM, Fabrício L, Mendes-Sousa AF, et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112(1):53–62.

Ribeiro RR, Silva SM, Fulgêncio GO, Michalick MSM, Frézard FJG. Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2013;22(3):373–8.

Rocha ICM, Santos LHM, Coura-Vital W, Cunha GMR, Magalhães FC, Morais M, et al. Effectiveness of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Surveillance and Control Programme in reducing the prevalence and incidence of *Leishmania infantum* infection. *Parasit Vectors.* 2018a;11:1–12.

Rocha MAN, Matos-Rocha TJ, Ribeiro CM, Abreu SR. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in State of Alagoas, Northeast, Brazil. *Braz J Biol.* 2018b; 78(4):609-614.

Romero GAS, Sampaio RNR, De Oliveira Machado V, Marsden PD. Sensitivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94(4):505–8.

Romero GAS, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - A systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 19;4(1):e584.

Santos HD, Galvão SR, Dias FEF, Ribeiro TMP, Negreiros Filho O, Sousa SAP, et al. High frequency of visceral leishmaniasis in dogs under veterinary clinical care in an intense transmission area in the state of Tocantins, Brazil. Cienc Rural. 2017;47(3):3–8.

Santos TR, Carreira VS, Ferrari HF, Moreira MAB, Luvizotto MCR. Comparison of PCR with stained slides of bone marrow and lymph nodes aspirates with suspect diagnosis for leishmaniasis. Acta Trop. 2014; 140:137–40.

Schlein Y, Jacobson RL, Messer G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by Bite. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(20):9944–8.

Schubach EYP, Figueiredo FB, Romero GAS. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2014;108:568–74.

Schubach, EYP. Validação da técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras de sangue total e soro. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical, Área de concentração: Epidemiologia das doenças infecciosas e parasitárias) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

Séguin O, Descoteaux A. *Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. Cell Immunol 2016;309(8):1–6.

Sevá ADP, Mao L, Galvis-Ovallos F, Tucker Lima JM, Valle D. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. PLoS Negl Trop Dis 2017a;11(2):e0005353.

Sevá ADP, Martcheva M, Tuncer N, Fontana I, Carrillo E, Moreno J, et al. Efficacies of prevention and control measures applied during an outbreak in Southwest Madrid, Spain. PLoS One. 2017b;12(10):1–24.

Sevá ADP, Ovallos FG, Amaku M, Carrillo E, Moreno J, Galati EAB, et al. Canine-based strategies for prevention and control of visceral leishmaniasis in Brazil. PLoS One. 2016;11(7):e0160058.

Silva CJ, Mattos CB, Felipin KP, Silva HP, Catanhêde LM, Porrozzi R, et al. Case Report: First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Rondônia, Brazil, a region with no history of visceral leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop. 2018a;51(5):712–5.

Silva GJ. (Especialização) Estudo Descritivo da Leishmaniose Canina no Distrito Federal. Estudo descritivo da leishmaniose canina no Distrito Federal. Fundação Oswaldo Cruz, Brasília; 2018.

Silva JP, Werneck GL, Macedo EC, Carvalho H, Pires-e-Cruz MS. Factors associated with *Leishmania chagasi* infection in domestic dogs from Teresina, State of Piauí, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2012;45(4):480–4.

Silva RA, Andrade AJ, Quint BB, Raffoul GES, Werneck GL, Rangel EF, et al. Effectiveness of dog collars impregnated with 4 % deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018b;113(5):e170377.

Silva STP, Marques LDFV, Coelho LKC, De Castro JM, Borja-Cabrera GP. Leishmaniose visceral human : reflexões éticas e jurídicas acerca do controle do reservatório canino no Brasil. Rev Bioética y Derecho. 2017;39(c):135–51.

Soccol VT, Pasquali AKS, Pozzolo EM, Souza LA, Chiyo L, Baggio RA, et al. More than the eyes can see: The worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. PLoS One. 2017;12(12):1–18.

Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. Parasit Vectors 2011;4(1):86.

Sousa TC de, Francisco APR, Santos IB dos. Leishmaniose Canina em Brasília, DF: Uma revisão de literatura. T Actas Saude Col. 2015;9(3):187–202.

Testacicca MCS, Santos MS, Machado LM, Serufo AV, Doro D, Avelar D, et al. Antibody responses induced by Leish-Tec: an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. Vet Parasitol. 2014; 204(2-4):169-176.

Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schoönian G, Töz SO, Jaffe CL, Baneth G. Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt analysis. Plos Negl Trop Dis. 2010; 4(1):e851.

Teixeira AIP, Silva DM, Vital T, Nitz N, et al. Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018; 114: e180452.

Toepp AJ, Monteiro GRG, Coutinho JF V, Lima AL, Larson M, Wilson G, et al. Comorbid infections induce progression of visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2019;12(54):1–12.

Tommasi AS, Otranto D, Furlanello T, Tasca S, Cantacessi C, Breitschwerdt EB, et al. Evaluation of blood and bone marrow in selected canine vector-borne diseases. *Parasit Vectors* 2014;7:534.

Torreilha RBP, Utsunomiya YT, Batista LFDS, Bosco AM, Nunes CM, Ciarlini PC, et al. Prediction of lymph node parasite load from clinical data in dogs with leishmaniasis: An application of radial basis artificial neural networks. *Vet Parasitol*. 2017; 234:13–8.

Torreilha RBP, Utsunomiya YT, Bosco AM, Almeida BF, Pereira PP, Narciso LG, et al. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. *Prev Vet Med* 2016a;132(8):83–7.

Travi BL. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. *Biomedica*. 2014;34(1):7–12.

Travi BL, Dantas-Torres F, Miro G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;(e0006082):1–13.

Ursine RL, Dias JVL, Morais HA, Pires HHR. Human and canine visceral leishmaniasis in an emerging focus in Araçuaí, Minas Gerais: spatial distribution and socio-environmental factors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2016a;111(8):505–11.

Ursine RL, Paranaíba LF, Dias JVL, Morais HA, Pires HHR. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral humana e canina em municípios pertencentes à Superintendência Regional de Saúde de Diamantina, Minas Gerais, Brasil (2007-2012). *T Actas Saude Coletiva*. 2016b;10(1):179.

Vasconcelos TCB, Furtado MC, Belo VS, Morgado FN, Figueiredo FB. Canine susceptibility to visceral leishmaniasis: A systematic review upon genetic aspects, considering breed factors and immunological concepts. *Infect Genet Evol* 2017; pii: S1567-1348(17):30342–8.

Vulpiani PM, Iannetti L, Paganico D, Iannino F, Ferri N. Methods of control of the *Leishmania infantum* dog reservoir: State of the art. *Vet Med Int*. 2011;2011(6):215964.

Werneck GL. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. *Rev Saude Publica*. 2014;48(5):851–6.

Werneck GL, Costa CHN, Carvalho FAA, Pires e Cruz MS, Maguire JH, Castro MC. Effectiveness of insecticide spraying and culling of dogs on the incidence of *Leishmania infantum* infection in humans: a cluster randomized trial in Teresina, Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(10):e3172.

WHO. Trabalhando para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas: Primeiro Relatório da OMS sobre as doenças tropicais negligenciadas [Internet]. WHO, editor. WHO/HTM/NTD. Genebra: WHO/HTM/NTD; 2010. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-70449638449&partnerID=tZotx3y1> Acesso em 12 fev 2014

WHO Comittee. Control of the leishmaniasis. PubMed Commons. 2010;(949):21485694.

Zanette MF, Lima VMF, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RFDC, et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. Rev Soc Bras Med Trop. 2014;47(1):105–7.

Zou L, Chen J, Ruan S. Modeling and Analyzing the Transmission dynamics of visceral leishmaniasis. Math Biosci Eng. 2017;14(5):1585–604.

Zuben APB, Donalísio MR. Difficulties in implementing the guidelines of the Brazilian visceral leishmaniasis control program in large cities. Cad Saude Publica, 2016; 32 (6): e00087415.

Apêndice I: Ficha de avaliação clínica

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

NOME ANIMAL:		
NOME PROPRIETÁRIO:		
GENERO:	PESO:	
IDADE:	PELAGEM:	COR DA PELAGEM:
ECTOPARASITAS () SIM () NÃO - QUAL?		
ENDEREÇO:		
CONTATO:		

Ficha Clínica Adaptado do Protocolo de Casos Veterinários da HOOBET - Rio de Janeiro e Proenário et al., *Estadísticas Infecciones Zoonóticas (PAT) (Otras) and Citopatológicas (Infecciones) (Secae) In Dogs, 2004* *MedVet Inten Res Article ID 432808*

SINAL CLÍNICO/ESCORE	0	1	2	3	VALOR
CONDIÇÃO CORPORAL	() OBESO () NORMAL	() MAGRO	() MUITO MAGRO	() 3	
MUCOSAS	() NORMOCORADAS () HIPERCORADAS	() HIPOCORADAS	() ICTÉRICAS	() 3	
DESHIDRATAÇÃO	() AUSENTE	() LEVE	() MODERADA A FORTE	() 3	
ATROFIA MUSCULAR EM ALGUM MEMBRO	() AUSENTE	() LEVE	() MODERADA A FORTE	() 3	
LESÕES CUTÂNEAS	() NÃO	() SIM	() 2	() 3	
LINFADENOMEGALIA	() NÃO	() 1 A 2 LINFONODOS	() 2	() 3 ou MAIS GENERALIZADA	
HEPATOESPLENOMEGALIA	() NÃO	() SIM	() 2	() 3	
CONJUNTIVITE E/OU BLEFARITE	() NENHUMA	() UNILATERAL E LEVE	() UNILATERAL SEVERA () BILATERAL LEVE/MODERADA	() 3	
ULCERA E/OU CERATITE	() NENHUMA	() UNILATERAL E LEVE	() UNILATERAL SEVERA () BILATERAL LEVE/MODERADA	() 3	
EPISTAXE	() AUSENTE	() PRESENTE	() 2	() 3	
ULCERAS E/OU NÓDULOS NA BOCA	() AUSENTE	() 1 A 2	() 3 OU MAIS	() 3	
VÔMITO	() AUSENTE	() PRESENTE	() 2	() FREQUENTE E COM SANGUE	
DIARRÉIA	() AUSENTE	() PRESENTE	() 2	() 3	
CLAUDICAÇÃO	() AUSENTE	() PRESENTE	() 2	() 3	
ERITEMA	() AUSENTE	() 1 A 25% DO CORPO	() 25 A 40% DO CORPO	() MAIS DE 40% DO CORPO	
DERMATITE ESFOLIATIVA SECA	() AUSENTE	() 1 A 25% DO CORPO	() 25 A 40% DO CORPO	() MAIS DE 40% DO CORPO	
DERMATITE ULCERATIVA	() AUSENTE	() 1 A 25% DO CORPO	() 25 A 40% DO CORPO	() MAIS DE 40% DO CORPO	
DERMATITE NODULAR	() AUSENTE	() 1 A 25% DO CORPO	() 25 A 40% DO CORPO	() MAIS DE 40% DO CORPO	
DERMATITE PUSTULAR	() AUSENTE	() 1 A 25% DO CORPO	() 25 A 40% DO CORPO	() MAIS DE 40% DO CORPO	
ALOPECIA	() AUSENTE	() 1 A 25% DO CORPO	() 25 A 40% DO CORPO	() MAIS DE 40% DO CORPO	
PIGMENTAÇÃO ALTERADA	() AUSENTE	() PRESENTE	() 2	() 3	
HIPERQUERATOSE DAS TRUFAS E COXINS	() AUSENTE	() PRESENTE	() 2	() 3	
ONICOGRIPOSE	() AUSENTE	() PRESENTE	() 2	() 3	

Apêndice II: Orientações para o preenchimento da ficha de avaliação clínica

Orientações para o preenchimento da Ficha de Avaliação Clínica.

1. Características corporais
 - 1.1. Idade: a referida pelo proprietário
 - 1.2. Pelagem classificar em curta, média e longa. Seguir como padrão os exemplos com as raças: pelo curto: *pit bull*, pelo médio: *pastor alemão*, pelo longo: *colie border*
 - 1.3. Presença de ectoparasitas: responder sim/ não e qual foi observado. Dos tipos a serem observados: pulgas, carrapatos e piolhos.
2. Condição corporal
 - 2.1. Obeso/Acima do Peso: as costelas podem estar imperceptíveis ou quase devido ao excesso de gordura no tecido subcutâneo. A visão superior, a cintura está quase pouco marcada ou ausente. Depósitos de gordura visíveis na região da base do rabo e/ ou na lombar.
 - 2.2. Normal: costelas visíveis e palpáveis. Curvatura abdominal visível sob inspeção lateral, cintura visível sob inspeção superior.
 - 2.3. Magro: curvatura abdominal bem marcada, costelas bem marcadas e cobertas pelo mínimo de gordura. Sob visão superior, cintura bem marcada.
 - 2.4. Muito magro: Costelas, vértebras lombares e ossos da pelve visíveis e bem marcados. Curvatura abdominal e cintura bem marcada.
3. Mucosas. Avaliar estado geral das mucosas, checar todas na medida do possível. Lembrando que nem sempre é possível checar todas por características do animal. Avaliar em: normal, hipercorada, hipocorada e icterica.
4. Atrofia muscular em algum membro: observar se tem algum membro com atrofia muscular aparente. Não julgar a causa. Classificar: Leve, moderada/severa
5. Lesões cutâneas: identificar presença e/ou ausência de lesões cutâneas, não julgar as causas.
6. Hepato-esplenomegalia: indicar se ausente ou presente, seja em um só órgão ou nos dois.
7. Conjuntivite e blefarite: examinar os dois olhos. Classificar em unilateral leve, ou bilateral leve a severa.
8. Uveíte e ceratite: examinar os dois olhos. Classificar em unilateral leve, ou bilateral leve a severa.
9. Epistaxe: indicar se ausente ou presente
10. Úlceras e ou nódulos na boca: verificar se o animal possui úlceras e/ou nódulos na boca, identificar se são alguns isolados (um ou dois) ou se são vários (a partir de três).
11. Dermatites esfoliativa seca, ulcerada, nodular e alopecia
 - 11.1. Se presentes, identificar se atingem até 25% do corpo; de 25% a 40% do corpo ou mais de 40% do corpo.
 - 11.2. As dermatites e a alopecia podem se sobrepor em alguma parte do corpo, tentar avaliar cada uma separadamente.

12. Pigmentação alterada: observar se qualquer parte do corpo apresenta uma coloração alterada.
13. Hiperqueratose das trufas e coxins: classificar se presente ou ausente.
14. Onicogrifose: classificar se presente ou ausente.

Apêndice III: Bloco I – variáveis relacionadas ao status socioeconômico

Itens do questionário de avaliação do poder aquisitivo

CLASSIFICAÇÃO SOCIO-ECONÔMICA

POSSE DE ITENS	QUANTIDADE DE ITENS				
	0	1	2	3	4 OU +
TELEVISÃO A CORES	0	1	2	3	4
RÁDIO	0	1	2	3	4
BANHEIROS	0	4	5	6	7
AUTOMÓVEL	0	4	7	9	9
EMPREGADA MENSALISTA	0	3	4	4	4
MÁQUINA DE LAVAR	0	2	2	2	2
GELADEIRA	0	4	4	4	4
FREEZER OU GELADEIRA DUPLEX	0	2	2	2	2

GRAU DE INSTRUÇÃO DO CHEFE DE FAMÍLIA

NOMECLATURA ANTIGA	NOMECLATURA ATUAL	PONTOS
ANALFABETO/PRIMÁRIO INCOMPLETO	ANALFABETO/FUNDAMENTAL 1 INCOMPLETO	0
PRIMÁRIO COMPLETO/GINASIAL INCOMPLETO	FUNDAMENTAL 1 COMPLETO/ FUNDAMENTAL 2 INCOMPLETO	1
GINASIAL COMPLETO/COLEGIAL INCOMPLETO	FUNDAMENTAL 2 COMPLETO/ MÉDIO INCOMPLETO	2
COLEGIAL COMPLETO/SUPERIOR INCOMPLETO	MÉDIO COMPLETO/ SUPERIOR INCOMPLETO	4
SUPERIOR COMPLETO	SUPERIOR COMPLETO	8

PONTUAÇÃO CLASSE ECONÔMICA: _____

Apêndice IV: Blocos II e III variáveis relacionadas as características do ambiente residencial e as de cuidados ofertados aos cães

Bloco II

QUESTÕES SOBRE O COTIDIANO

1. POSSUI OUTRO ANIMAL?	0 NEGATIVO	1 POSITIVO
2. QUAIS?	() CÃO () GATO	() AVES () PORCOS () PEQUENOS MAMÍFEROS () RÉPTEIS
3. O SERVIÇO DE ZOONOSES/DIVAL JÁ VISITOU SUA RESIDÊNCIA?	0 NEGATIVO	1 POSITIVO
4. VOCÊ SABE O QUE É LEISHMANIOSE VISCERAL?	0 NEGATIVO	1 POSITIVO
5. VOCÊ SABE COMO A LEISHMANIOSE VISCERAL É TRANSMITIDA?	0 NEGATIVO	1 POSITIVO
6. VOCÊ SABE COMO SÃO OS SINTOMAS EM SERES HUMANOS?	0 NEGATIVO	1 POSITIVO
7. VOCÊ SABE SE EXISTE CURA PARA OS CÃES?	0 NEGATIVO	1 POSITIVO
8. VOCÊ SABE SE EXISTE VACINA CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA?	0 NEGATIVO	1 POSITIVO
9. DAS OPÇÕES A SEREM APRESENTADAS, QUAL QUE VOCÊ ACHA CORRETA PARA O CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL?	1. NÃO SEI.	4. ACOMPANHAMENTO DA POPULAÇÃO CANINA.
	2. ACOMPANHAMENTO DA POPULAÇÃO HUMANA E CANINA.	5. VACINAÇÃO
	3. MANEJO AMBIENTAL	6. COMBATE AO VETOR.

QUESTÕES SOBRE RESIDÊNCIA

1. TEM QUINTAL?	0 NEGATIVO	1 POSITIVO
2. QUAL O TIPO?	1 TERRA	2 GRAMADO, 3 CIMENTADO 4 PRESENÇA DE MATÉRIA ORGÂNICA
3. AS JANELAS DA RESIDÊNCIA SÃO TELADAS?	0 NEGATIVO	1 POSITIVO
4. VOCÊ USA ALGUM TIPO DE INSETICIDA/VENENO	0 NEGATIVO	1 POSITIVO
5. QUAIS?	1. VENENO CONTRA BARATA	4. DEDETIZAÇÃO PROFISSIONAL
	2. RATICIDA	
	3. REPELENTE GENÉRICO (baygon, elétrico, cinzas, cheiro...)	

Bloco III

MANEJO ANIMAL

1. QUAL O TIPO DE ALIMENTAÇÃO É OFERECIDA AO ANIMAL	1 ALIMENTO ESPECÍFICO	2 COMIDA CASEIRA COMUM		
2. ANIMAL É VACINADO	0 NEGATIVO		1 POSITIVO	
3. QUAIS VACINAS?	1 RAIVA	2 V8/V10	3 GIÁRDIA	4 TOSSE DOS CANIS
4. O ANIMAL TEM ACESSO A AMBIENTES EXTERNOS A CASA?	0 NEGATIVO		1 POSITIVO	
4. COMO É O ACESSO DO ANIMAL A AMBIENTES EXTERNOS?	1 SEMPRE. FICA NO QUINTAL 2 ACESSO LIVRE A TODOS AMBIENTES DA CASA, INCLUSIVE O QUINTAL		3. SOMENTE DURANTES CAMINHADAS, PELA MANHÃ E/OU PELO FIM DA TARDE	
5. EM QUAL LUGAR O CÃO DORME?	1. LOCAL ESPECÍFICO DENTRO DE CASA			
	2. SOLTO NO QUINTAL			
	3. ABRIGO ESPECÍFICO			
6. FAZ USO DE ALGUM PRODUTO REPELENTE EXCLUSIVO PARA ANIMAIS?	0 NEGATIVO		1 POSITIVO	
7. QUAIS?	1 SHAMPOO/SABONETE ANTIPULGAS		4 BORRIFICAÇÃO CANIL/CASINHA	
	2 COLEIRA COMUM CONTRA ECTOPARASITAS		5 PRODUTO <i>SPOT-ON</i>	
	3 COLEIRA ESPECÍFICA CONTRA ECTOPARASITAS E MOSQUITOS		6 OUTROS	
8. NO ÚLTIMO ANO, QUANTAS VEZES TEVE QUE LEVAR O ANIMAL AO VETERINÁRIO?	1 Zero		3 Três ou mais	
	2 Uma a duas			
9. O ANIMAL TEM EMAGRECIDO?	0 NEGATIVO		1 POSITIVO	
10. QUANTO TEMPO NOTOU ISSO? (em dias)				

Apêndice V: Orientações sobre O Preenchimento Do Questionário

1. Explicar ao proprietário que pode responder o questionário livremente, sem se preocupar em fornecer respostas erradas
2. No bloco I, caso perguntar, explicar que essas perguntas servem para conhecer o perfil social do proprietário e não justificar sobre cada item.
3. No bloco I, sobre o grau de instrução, ainda existe a nomenclatura antiga, caso seja uma pessoa mais idosa que esteja respondendo e que assim não hajam dúvidas

4. Para os itens 2-8 do segundo bloco informar que ao final as dúvidas e informações corretas serão fornecidas a respeito.
 - a. Esclarecer as duvidas de forma simples e concisa sobre a LV, transmissão e risco do cão quanto reservatório. Explicar brevemente o porque fazer a vigilância epidemiológica dos cães e meios de prevenção. E então apresentar o item 9.
5. Quando a casa tiver quintal, observar o tipo, se a área do quintal é, em sua maior parte, cimentada ou com vegetação/terra.
6. Obsevar presença de matéria orgânica acumulada no quintal: lixo orgânico ou folhagem de árvores acumuladas.
7. Sobre manejo animal:
 - a. Alimento específico: ração e todo alimento que seja preparado de forma adequada para um cão
 - b. Item 2: ser vacinado: ter recebido alguma vacina, não é específico para leishmaniose.
 - c. Item 5: o abrigo específico é um canil estruturado fora da residência.
 - d. Item 7.6 qualquer produto aplicado no animal com intuito de ser repelente.
8. Item 4 do segundo bloco é se o proprietário usa algo que evite insetos e pragas na casa. E o item 5 para discriminar o que é usado
9. No terceiro bloco, perguntar com calma as questões, com cuidado para não induzir respostas

Apêndice VI – Tabelas de Covariância

Correlações

		PELAGEM CLARA	PELAGEM CURTA
PELAGEM CLARA	Coeficiente de Correlação	1,000	-,047
	Sig. (2 extremidades)	.	,580
	N	143	140
PELAGEM CURTA	Coeficiente de Correlação	-,047	1,000
	Sig. (2 extremidades)	,580	.
	N	140	155

Correlações

		RESIDÊNCIA TEM QUINTAL	QUINTAL COM PREDOMINANCIA DE TERRA E GRAMA	QUINTAL COM PRESEÇA DE MATERIA ORGANICA	USO DE TELAS NA JANELAS	QUINTAL COM PREDOMINANCIA DE ÁREAS CIMENTADAS	CONVIVER COM OUTROS ANIMAIS
RESIDÊNCIA TEM QUINTAL	Coeficiente de Correlação	1,000	,466**	,267**	-,013	,146	-,024
	Sig. (2 extremidades)	.	,000	,001	,873	,073	,772
	N	151	151	151	151	151	151
QUINTAL COM PREDOMINANCIA DE TERRA E GRAMA	Coeficiente de Correlação	,466**	1,000	,482**	-,156	-,770**	,023
	Sig. (2 extremidades)	,000	.	,000	,055	,000	,780
	N	151	151	151	151	151	151
QUINTAL COM PRESEÇA DE MATERIA ORGANICA	Coeficiente de Correlação	,267**	,482**	1,000	-,079	-,346**	,037
	Sig. (2 extremidades)	,001	,000	.	,336	,000	,653
	N	151	151	151	151	151	151
USO DE TELAS NA JANELAS	Coeficiente de Correlação	-,013	-,156	-,079	1,000	,202*	-,062
	Sig. (2 extremidades)	,873	,055	,336	.	,013	,447
	N	151	151	151	151	151	151
QUINTAL COM PREDOMINANCIA DE ÁREAS CIMENTADAS	Coeficiente de Correlação	,146	-,770**	-,346**	,202*	1,000	-,023
	Sig. (2 extremidades)	,073	,000	,000	,013	.	,784

N	151	151	151	151	151	151	
CONVIVER COM OUTROS ANIMAIS	Coefficiente de Correlação	,024	,023	,037	,062	,023	1,000
	Sig. (2 extremidades)	,772	,780	,653	,447	,784	.
	N	151	151	151	151	151	151

** . A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

* . A correlação é significativa no nível 0,05 (2 extremidades).

Correlações

		CONHECIMENTOS SOBRE SINTOMAS LVH	ANIMAL TER RECIBO ALGUM TIPO DE VACINA ALGUM MOMENTO NA VIDA	COMPARECEU A PELO MENOS UMA CONSULTA COM MEDICO VET NO ULTIMO ANO	ESCORE PODER AQUISITIVO
CONHECIMENTOS SOBRE SINTOMAS LVH	Coefficiente de Correlação	1,000	,128	,020	,022
	Sig. (2 extremidades)	.	,118	,807	,787
	N	151	151	151	150
ANIMAL TER RECIBO ALGUM TIPO DE VACINA ALGUM MOMENTO NA	Coefficiente de Correlação	,128	1,000	,206*	,018
	Sig. (2 extremidades)	,118	.	,011	,826

VIDA	N	151	151	151	150
COMPARECEU A PELO MENOS UMA CONSULTA COM MED VET NO ULTIMO ANO	Coeficiente de Correlação	,020	,206*	1,000	-,048
	Sig. (2 extremidades)	,807	,011	.	,556
	N	151	151	151	150
ESCORE PODER AQUISITIVO	Coeficiente de Correlação	,022	,018	-,048	1,000
	Sig. (2 extremidades)	,787	,826	,556	.
	N	150	150	150	150

*. A correlação é significativa no nível 0,05 (2 extremidades).

Apêndice VII – Artigo publicado

ORIGINAL ARTICLE

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 114: e180452, 2019

Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests

Ana Izabel Passarella Teixeira¹, Debora Marcolino Silva¹, Tamires Vital^{1,2}, Nadjar Nitz², Bruna Caroline de Carvalho¹, Mariana Hecht², Diana Oliveira³, Edward Oliveira³, Ana Rabello³, Gustavo Adolfo Sierra Romero^{1/+}

¹Universidade de Brasília, Núcleo de Medicina Tropical, Brasília, DF, Brasil

²Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Laboratório Interdisciplinar de Biociências, Brasília, DF, Brasil

³Grupo de Pesquisas Clínicas e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Belo Horizonte, MG, Brasil

BACKGROUND Studies aimed at validating canine visceral leishmaniasis diagnostic tests present heterogeneous results regarding test accuracy, partly due to divergences in reference standards used and different infection evolution periods in animals.

OBJECTIVE This study aimed to evaluate the accuracy of the rapid test-dual path platform (TR-DPP) (Biomanguinhos®), EIEleishmaniose-Visceral-Canina-Biomanguinhos (EIE-LVC) (Biomanguinhos®), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) rK39 (in-house), and the direct agglutination test (DAT-*Canis*) against a reference standard comprising parasitological and molecular techniques.

METHODS A phase II/III validation study was carried out in sample sera from 123 predominantly asymptomatic dogs living in an area endemic for visceral leishmaniasis.

FINDINGS Sixty-nine (56.1%) animals were considered infected according to the reference standard. For each test, the sensitivity and specificity, respectively, were as follows: TR-DPP, 21.74% [confidence interval (CI)95% 13.64% to 32.82%] and 92.59% (CI95% 82.45% to 97.08%); EIE-LVC, 11.59% (CI95% 5.9% to 21.25%) and 90.74% (CI95% 80.09% to 95.98%); ELISA rK39, 37.68% (CI95% 27.18% to 49.48%) and 83.33% (CI95% 71.26% to 90.98%); and DAT-*Canis*, 18.84% (CI95% 11.35% to 29.61%) and 96.30% (CI95% 87.46% to 98.98%).

CONCLUSION We concluded that improving the sensitivity of serum testing for diagnosing asymptomatic dogs must constitute a priority in the process of developing new diagnostic tests to be used in the visceral leishmaniasis control program in Brazil.

In the American continent, the control of metazoontic canine visceral leishmaniasis (CVL) is crucial for reducing the occurrence of human visceral leishmaniasis (HVL); the dog is the main reservoir for *Leishmania (Leishmania) infantum*, the etiological agent of CVL in urban areas.^(1,2)

The Brazilian Leishmaniasis Control Program prescribes detection and euthanasia for infected dogs, among other measures. The program sequentially uses two serological tests, which present a lower diagnostic accuracy in asymptomatic dogs or in those in the initial stages of the infection.^(3,4,5,6,7,8) Although some works indicate that serological tests may be used with efficacy for diagnosing asymptomatic animals,^(6,9) the performance of serological tests may be up to 20% inferior to the performance of molecular tests in that subgroup.^(7,8,9,10)

doi: 10.1590/0074-02760180452

Financial support: FAPDF (grant no. 193.000.867/2015 and the public call 06/2013 grant no. 193.000.233/2014), CNPq (grant no. 142247/2015-4). AIPT received a CAPES PhD scholarship.

+ Corresponding author: gromero@unb.br

✉ <http://orcid.org/0000-0003-1425-926X>

Received 25 September 2018 Accepted 4

January 2019



Molecular diagnostic tests are not routinely used in public health programs because of the relative difficulties regarding the need for complex laboratorial infrastructure, the elevated costs, and the lack of commercially available assays, as well as other limitations.^(7,8,9,10)

The diagnosis for animals with symptomatic CVL has fewer problems because those animals often present levels of antibodies that are specifically detectable through serological tests that are commercially available.^(11,12,13) Symptomatic animals also present a higher parasite load, allowing its detection in peripheral blood and tissues through molecular diagnosis methods.⁽¹⁴⁾

The role of infected dogs that remain asymptomatic in the transmission cycle of visceral leishmaniasis among dogs and from dogs to humans has not been widely clarified. Theoretically, a smaller parasite load in asymptomatic dogs would translate to a lower infectious capacity in sand flies. However, asymptomatic animals constitute most of the infected population, which means that they could be effectively relevant in transmitting the parasite to its vectors.^(15,16,17,18)

Considering that most infected dogs remain asymptomatic for long periods, it is important that infected animals are accurately detected, regardless of the control measure to be applied to that canine population. In fact, mathematical modelling indicates that the key to the potential success of CVL control may be the identification of asymptomatic dogs.^(19,20)

In that sense, new diagnostic tests are under development with promising results in their initial stages,^(21,22,23,24) but however, it is necessary to challenge these against a robust reference standard. The current context is characterised by a lack of consensus about the best reference standard for the validation of diagnostic tests for CVL, and few studies have used reasonably adequate reference standards.^(5,25)

Among the tests under development, the DAT-*Canis* is based on the direct agglutination principle, which uses *Leishmania infantum* raw antigen. The test was developed by René-Rachou Institute (Fiocruz, Minas Gerais), and its prototype consists of a kit that allows up to 480 reactions at low costs (US\$0.44/reaction, considering inhouse testing), with a simple methodology of execution, and no need for complex laboratorial infrastructure.

The present research aimed to study the accuracy of certain tests against a reference standard constituted of a combination of parasitological and molecular techniques. The tests evaluated were as follows: rapid test-dual path platform (TR-DPP) (Biomanguinhos®); EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Biomanguinhos (EIE-LVC) (Biomanguinhos®), which is currently recommended for CVL diagnosis in Brazil; the immunoenzymatic test using recombinant antigen rK39 (in-house); and the direct agglutination test (DAT-*Canis*) for serum samples from dogs resident in an endemic area of the Federal District of Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Type of study - This was a phase II/III validation study⁽²⁶⁾ in serum samples collected consecutively in a random, non-preselected sample of dogs that reside in an endemic area for visceral leishmaniasis.

Samples - The samples used in this study are part of a biobank kept at the Laboratory for Leishmaniasis at the Centre for Tropical Medicine (NMT/FM/UnB) obtained during the study "Risk, diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in the Federal District". Samples were collected from dogs residing in an endemic area of the Federal District. They participated in the baseline assessment for a cohort study aiming to determine the role of socioeconomic factors and owner care on the risk of CVL acquisition. The dogs included in this study were randomly selected, and sample collection was done in the period between October 2015 and May 2017.

The criteria for sample inclusion in the present validation study were to have sufficient biological material available for carrying out serological testing, and to have taken all tests that composed the reference standard.

Clinical assessment - The dogs were clinically evaluated without previous knowledge of their infection status, and a signal score was attributed to each one according to a model adapted from that used by Proverbio et al.,⁽¹²⁾ which consisted of clinical aspects listed as items in a table with intensity degrees (Table I). The model used by us excluded the items that could not be determined through a single physical exam. The excluded items were appetite alterations, mental state alterations, intolerance to exercise, weight loss, polyuria, polydipsia, and proteinuria. These items, at their highest intensities, could have added up to 20 points to the score.

Since there was more than one veterinarian practitioner collecting samples and physical exams, other items, the assessment of which might have been subjective, were altered, such that only the presence or absence of these signals would be detected. These items were skin lesions, hepatosplenomegaly, epistaxis, vomiting, diarrhoea, claudication, altered pigmentation, hyperkeratosis, and onychogryphosis. This caused the exclusion of these items, which, at their highest intensities, could have added up to 21 points to the score.

Upon applying these adaptations to a pilot project with 20 assessments and two veterinarians, the modified clinical score could reach a maximum of 46 points instead of the 87 points obtained in the initial model.

Composite reference standard - The reference standard was composed by the following tests: amastigotes visualisation in the bone marrow smear; promastigotes isolation in bone marrow culture; parasite DNA detected by conventional polymerase chain reaction (PCR) targeting the conserved region of kDNA (and confirmed by PCR targeting the ITS1 gene) in peripheral blood and the bone marrow; and parasite DNA detected through the real time PCR technique (qPCR) targeting kDNA in the blood and the bone marrow.

All animals were submitted to all the tests composing the reference standard.

Case definition - The animal was considered infected when there was a positive result to any of the exams in the reference standard. The animal was considered not infected when there was a negative result in every test included in the reference standard.

Execution of reference standard tests - The professionals who executed the reference standard tests did not have knowledge of the characteristics of the animal that was the source of the samples.

Bone marrow smears were stained with Giemsa (Merck®) or Panótico (Instant Prov, Laboratory NewProv) for direct examination of the slides and observed in an optical microscope with an objective of 100x and immersion oil to identify amastigote forms.⁽²⁷⁾ For each dog, at least two slides were examined.

A drop of aspirated bone marrow was inoculated into culture medium that was prepared according to the methodology adopted in the Leishmaniasis Laboratory in the Centre for Tropical Medicine of the University of Brasilia. Each sample was inoculated in duplicate, and the tubes were assessed every two days in an inverted optical microscope to seek typical movement that would indicate the presence of *Leishmania* spp. promastigotes during the 30-day period.⁽²⁸⁾

Molecular tests - The conventional PCR method targeting kDNA⁽²⁹⁾ was chosen for triaging the sample, and the ITS1 assay⁽³⁰⁾ was used to confirm the presence of *Leishmania* spp. All precautions to avoid contamination were applied, including performing the pre-PCR, PCR, and post-PCR procedures in separate environments.

TABLE I

Modified clinical score for canine visceral leishmaniasis (CVL) according to the adaptation from the model by Proverbio et al.⁽¹²⁾

Findings	Score			
	0	1	2	3
Bodily condition	Obese/Normal	Thin	Cachectic	--
Mucosae	Normal	Pale	Jaundiced	--
Dehydration	Absent	Light	Moderate to intense	--
Muscle atrophy on limbs	Absent	Light	Moderate to intense/widespread	--
Skin lesions	Absent	Present	--	--
Hepatosplenomegaly	Absent	Present	--	--
Conjunctivitis and / or Keratitis	Absent	Unilateral and light	Severe unilateral / bilateral	--
Uveitis and / or Blepharitis	Absent	Unilateral and light	Severe unilateral / bilateral	--
Lymph adenomegaly	Absent	1 to 2 lymph nodes	--	3 or more / widespread
Epistaxis	Absent	Present	--	--
Mouth ulcers or nodules	Absent	1 to 2	3 or more	--
Vomit	Absent	Present	--	Frequent, with vomit
Diarrhea	Absent	Present	--	--
Claudication	Absent	Present	--	--
Erythema	Absent	1 to 25% of the body	25 to 40% of the body	40% or more of the body
Dry exfoliative dermatitis	Absent	1 to 25% of the body	25 to 40% of the body	40% or more of the body
Ulcerative dermatitis	Absent	1 to 25% of the body	25 to 40% of the body	40% or more of the body
Nodular dermatitis	Absent	1 to 25% of the body	25 to 40% of the body	40% or more of the body
Pustular dermatitis	Absent	1 to 25% of the body	25 to 40% of the body	40% or more of the body
Alopecia	Absent	1 to 25% of the body	25 to 40% of the body	40% or more of the body
Altered pigmentation	Absent	Present	--	--
Hyperkeratosis of truffles and cushions	Absent	Present	--	--
Onychogryphosis	Absent	Present	--	--

DNA extraction - After transport in refrigerated thermal boxes, the samples of blood mixed with EDTA were kept at -20°C until processing. DNA was extracted using the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions for a 300 µL sample. Lastly, the extracted DNA was hydrated overnight using 100 µL of hydration solution. For each extraction procedure, an ultra-pure water negative control was included.

kDNA-conserved region PCR - The reaction was carried out using one forward: 5'GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3' and two backward: BW-CA: 5'CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC

3' and BW-B: 5'GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC 3' targeting 120 bp of the kDNA-conserved region.⁽²⁹⁾ Genomic DNA samples extracted from *Leishmania infantum* (MCER/BR/79/M6445), *L. (L.) amazonensis* (MHOM/ BR/75/M2904), and *L. (Viannia) braziliensis* (IFLA/ BR/67/PH8) were used as positive controls, and the same negative control was used as in the extraction step.

A 10 µL reaction was done with 1 µL of DNA sample, 0.3 µL of Taq (5 U), 1 µL of dNTPs (0.5 mM), 0.5 µL initiators BW-B and BW-CA (in the concentration of 10 µM) and 1.0 µL FW (10 µM), 1 µL of MgCl₂ (50 mM) and 1 µL of 5X buffer. The reaction was carried out in a Techne FTC-PLUS thermocycler (Bibby Scientific LTD, United Kingdom) with the following settings: initial denaturalisation of 95°C for 5 min, 35 cycles (heating at 95°C for 30 s, annealing at 64°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s), and final extension at 72°C for 5 min.

ITS1 gene PCR - The ITS reaction was carried out using ITS-219F primers (5' AGC TGG ATC ATT TTC CGA TG 3') and ITS-219R (5' ATC GCG ACA CGT

TAT GTG AG 3'); the size of the amplicon was 265 bp.⁽³⁰⁾ For that group of PCR reactions, the positive control was DNA extracted from a *L. infantum* promastigote culture (MCER/BR/79/M6445). For the negative control, MilliQ water was used. The reaction was done in a total volume of 25 µL, with 3 µL DNA, 0.5 µL of each primer (10 µM), 0.2 µL of dNTPs (0.5 mM), 5.0 µL of buffer 5X, 0.3 µL of Taq (5U), and 0.75 µL of MgCl₂ (50 mM). The reaction was performed in a thermocycler (Techne FTC-PLUS Bibby Scientific LTD, United Kingdom) using the following cycling conditions: initial denaturation at 95°C for 5 min; 40 cycles of heating at 95°C for 30 s, annealing at 57°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s; and final extension at 72°C for 5 min. The PCR products were maintained at 4°C until viewed in a 7.5% polyacrylamide gel (150 volts, 75 Amp for 90 min) followed by silver staining.

Real-time PCR (qPCR) - The reaction was set off with the primers 5' GGC CCA CTA TATTAC ACC AAC CCC 3' and 5' GGG GTA GGG GCG TTC TGC

GAA 3', as described by Pita-Pereira et al.⁽³¹⁾ Each reaction was carried out using 0.2 µM of each initiator, 2 µL of DNA samples (25 ng/µL), and 1X Power SYBR Green PCR Master Mix(2 µL), with the final volume per reaction being 20 µL. All reactions were conducted using two positive controls containing 5 ng/µL and 0.005 ng/µL of DNA extracted from the *L. infantum* promastigotes (MCER/BR/79/M6445). Two negative controls were also set: a blank without DNA and another control with DNA from HEK cell culture. The results were considered positive up to Ct 35, and showed a sensitivity of 0.005 ng/mL for *L. infantum* DNA. The results were classified as positive or negative. The thermocycler QuantStudio 3 (Applied Biosystems) was used to perform qPCR, with the following cycling conditions: initial denaturation at 94°C for 12 min and 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 8 s.

Serological tests - The TR-DPP® Leishmaniose Visceral Canina (Biomanguinhos, Rio de Janeiro, RJ, BR) and ELISA (EIE-Leishmaniose Visceral Canine) (Biomanguinhos®) tests were carried out in serum samples sent to the Environment Surveillance Laboratory of the Federal District (DIVAL), the government branch that is responsible for controlling zoonoses

in the Federal District. The tests were executed according to manufacturer's recommendations and to parameters established by the Ministry of Health.⁽³²⁾

The ELISA rK39 was carried out in the René-Rachou, Fiocruz, Research Institute in Belo Horizonte. The Nunc MaxiSorp plates were sensitised with a rK39 antigen at a concentration of 1 µg/mL diluted in carbonate/ bicarbonate (pH 9.6) in a wet chamber inside a refrigerator (2 to 8°C) overnight. Afterwards, they were frozen at -20°C until use. The plates were washed three times with a phosphate buffer containing Tween 0.05% (TFTween). Additionally, 200 µL/well of diluted 5% milk (TF-Tween-milk 5%) was added to each plate well and incubated for 2 h in a wet chamber at 37°C. After new lavages, the plates were incubated in a wet chamber at 37°C with 50 µL/well of anti-IgG canine conjugate with peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted 1:50.000 in 1% TF-Tween-Milk.

The plates were washed again and incubated for 5 min in the dark with TMB (tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich) at 50 µL/well, and the reaction was blocked with 50 µL/well of a solution of 1 N sulfuric acid. The reading was carried out using the FlexStation 3 MultiMode Microplate Reader (Molecular Device, San Jose, CA, USA) with a wavelength of 450/620 nm. The cut-off was defined by the average of absorbance readings in 13 negative control samples increased by two standard deviations. The samples that presented a difference in absorbance readings over 20% were retested.

DAT-Canis - The test kit used for serum agglutination, *DAT-Canis*, is composed of 10 lyophilised antigen vials containing stained promastigotes of *L. infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV), a rehydration solution vial, and a sample diluent vial.

First, the lyophilised antigen was rehydrated with 5 mL of rehydration solution. A total of 99 µL of sample diluent was deposited in the well in the first V-bottom plate column (Greiner BioOne Produtos Médicos Hospitalares, Americana, SP, BR) and 50 µL in the remaining ones (2nd to 4th). Next, 1 µL of the serum samples was diluted in the well from the first column, making a dilution of 1:100. Then the samples were diluted to 1:800. The plates were incubated for an hour at room temperature and 50 µL of the previously rehydrated antigen was added. The plates were agitated for 5 min and incubated for 18 h in a dark chamber. Positive and negative control sera were tested in

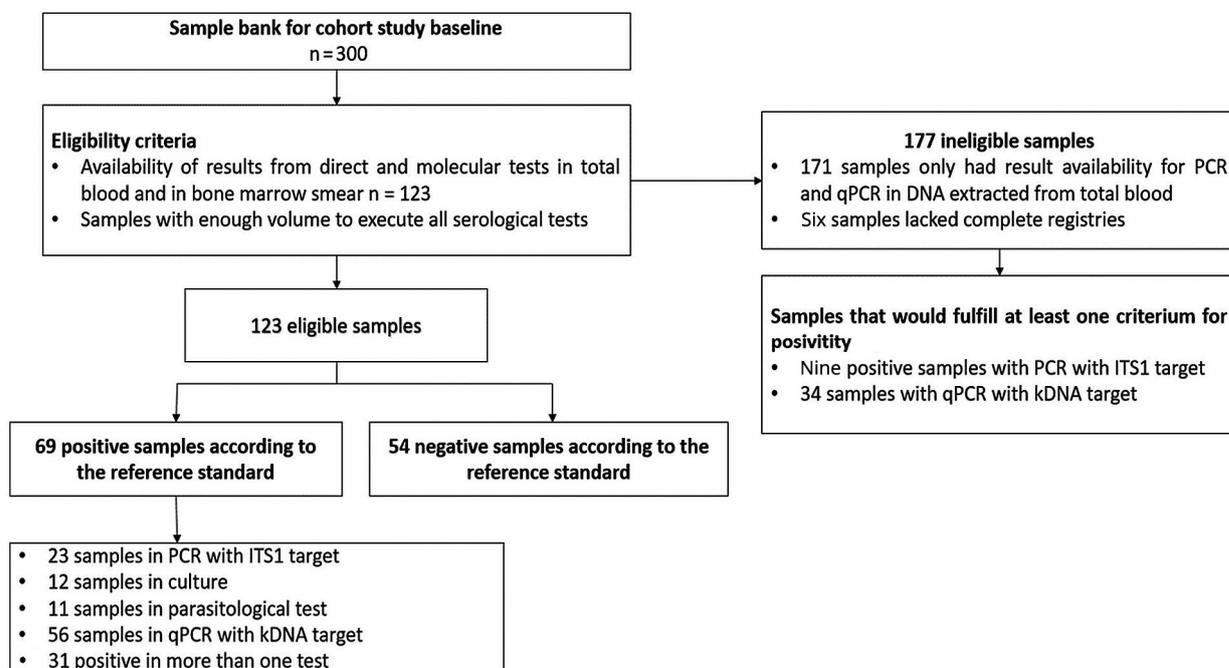


Fig. 1: sample selection flowchart.

parallel with each plate. The results were visually read with the naked eye. The cut-off adopted for defining positive and negative results was 1:400, as previously described.⁽²¹⁾ The positive samples from the qualitative test were retested in the same manner and diluted until they reached the proportion of 1:102,400.

Statistical analysis - The test results and information on the dogs that were the sources of the samples were tabulated in Microsoft Excel. The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, IBM, Armond, New York, United States) was used to calculate the accuracy parameters and their respective 95% confidence intervals. The accuracy was calculated with the sequential use of diagnostic testing in different combinations. The positive and negative predictive values were calculated along with the positive and negative likelihood ratios. A sensitivity analysis was done regarding the positive and negative predictive values for a hypothetical spectrum of infection prevalence values. Also, a comparison of the clinical score between infected and non-infected animals was performed with the Mann-Whitney U test.

Ethics - The collection of biological samples for the study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA, from the acronym in Brazilian Portuguese) at the Institute of Biological Sciences at the University of Brasília, under UnBDoc number 11253/2015.

Legally competent owners voluntarily consented to the participation of their animals in the study, and they signed consent forms.

RESULTS

Sixty-nine out of the 123 animals (56.09%) were considered infected according to the composite reference standard. From the animals that presented positive results in the reference standard, 36.23% (25/69) were positive during the screening with kDNA PCR and confirmed through ITS1 PCR; 17.39% (12/69) had positive culture and direct parasitological test; and 81.15% (56/69) were positive in the kDNA qPCR. The raw agreement among the tests that composed the reference standard is described in Supplementary data (Table I). Fig. 1 introduces the sample selection process.

Characteristics of dogs - All 123 dogs were housed in the Federal District, with 77 (62.6%) in the administrative area of Fercal, 39 (31.7%) from Sobradinho II, four (3.25%) from Lago Sul, and three (2.44%) from Plano Piloto. The referred average age of the dogs was 3.21 years (DP = 2.91 years). Sixty-two (50.41%) were male, 59 (47.97%) were female, and two animal registers did not include that information.

Most of the animals presented few or no CVL symptoms. The average score for clinical signs suggestive of CVL was 2.13 points (DP = 3.44 points; median = 1.0 point; quartiles 25 and 75 of 0 and 3 points, respectively). The dogs that were not infected and were completely asymptomatic (zero score) were 22/55 (40%), and the infected and asymptomatic dogs were 24/66 (36.36%). Out of the 55 non-infected dogs, 46 (83.64%) presented a score equal to or lower than 3, whereas 55 out of the 66 infected dogs (83.33%) presented a score equal to or lower than 3, as shown in Fig. 2.

Accuracy of serological tests - The positivity observed in serological tests was 15.4% (19/123) in TRDPP, 10.6% (13/123) in EIE-LVC, 28.5% (35/123) in ELISA rK39, and 12.2% (15/123) in DAT-*Canis*. The raw agreement among the serological tests is demonstrated in Supplementary data (Table II).

Table II presents the frequency of results in serological tests in relation to the reference standard and its accuracy values.

Several sequential combinations among the serological tests were evaluated. The specificity nearly always reached 100%.

The protocol recommended by the Ministry of Health, which used TR-DPP as screening test, would detect 19 samples as positive, and the EIE-LVC would confirm seven out of these 19 samples as positive. The combined sensitivity (7/69) would be 10.14% (CI95% 5.0 to 19.49), and the combined specificity (54/54) would be 100% (CI95% 93.36 to 100).

The combination of TR-DPP as screening tests followed by DAT-*Canis* as a confirmatory test would repeat the results from the Ministry protocol. However, if ELISA rK39 were the confirmatory test, out of the 19 positive samples from the screening, nine would be confirmed as positive. Thus, the sensitivity and specificity of that last combination would be 9/69 or 13.04% (CI95% 7.02 to 22.97) and 54/54 or 100% (CI95% 93.36 to 100), respectively.

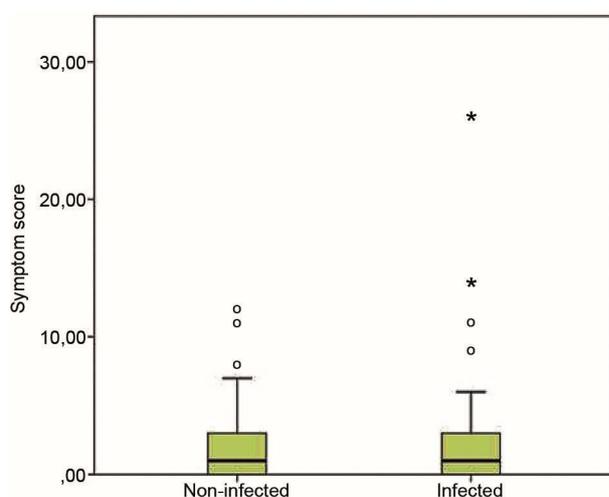


Fig. 2: distribution of clinical score for canine visceral leishmaniasis (CVL) in groups of infected and non-infected animals. Fifty-five non-infected dogs, median 1 (IQR:0-3; interval 0-12 points). Sixty-six infected dogs, median 1 (IQR:0-3; interval 0-26 points). (MannWhitney U test; $p = 0.708$).

TABLE II

Accuracy of serological tests for canine visceral leishmaniasis (CVL), Brasília, DF, 2017

Index tests	Reference standard		Test accuracy (%)		Likelihood ratio	
	Positive (+)	Negative (-)	Sensitivity (CI95%)	Specificity (CI95%)	Positive (CI95%)	Negative (CI95%)
DAT- <i>Canis</i> ^a	(+)	13	18.84	96.30	5.08	0.84
	(-)	56	(11.35 to 29.61)	(87.46 to 98.98)	(1.19 to 21.58)	(0.74 to 0.95)
EIE -LVC ^b	(+)	8	11.59	90.74	1.25	0.97
	(-)	61	(5.99 to 21.25)	(80.09 to 95.98)	(0.43 to 3.61)	(0.86 to 1.09)
R-DPP ^c	(+)	15	21.74	92.59	2.93	0.84
	(-)	54	(13.64 to 32.82)	(82.45 to 97.08)	(1.03 to 8.33)	(0.73 to 0.97)
ELISA rK39 ^d	(+)	26	37.68	83.33	2.26	0.74
	(-)	43	(27.18 to 49.48)	(71.26 to 90.98)	(1.15 to 4.41)	(0.60 to 0.93)

a: direct agglutination test; *b*: immuno-enzymatic assay for CVL; *c*: rapid test dual path platform; *d*: enzyme linked immunosorbent assay rk39.w

With DAT-*Canis* as a screening test, out of the 15 positive samples, seven would be confirmed by TR-DPP with a combined sensitivity of 7/69 or 10.14% (CI95% 5.0 to 19.49) and the combined specificity of 54/54 or 100% (CI95% 93.36 to 100).

Using DAT-*Canis* for screening and ELISA rK39 for confirmation, out of the 15 CVL positive samples, nine would be confirmed as being infected; their combined sensitivity would be 9/69 or 13.04% (CI95% 7.02 to 22.97), and their combined specificity would be 53/54 or 98.15% (CI95% 93.36 to 100). Supplementary data (Table III) provides further information on the accuracy figures for combined serological tests.

In the 56% prevalence of infection scenario observed in the actual sample of dogs, the positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) for the tests were as follows: DAT-*Canis*, 0.88 and 0.49; TR-DPP, 0.79 and 0.49; ELISA rK39, 0.74 and 0.53; and EIE-LVC, 0.60 and 0.55. The sensitivity analysis for PPV and NPV for a hypothetical scenario of infection prevalence between 0 and 70% demonstrated similar behaviour between the tests, as shown in Supplementary data (Figure).

DISCUSSION

The diagnostic protocol using TR-DPP as the screening test and EIE-LVC as the confirmatory test for CVL has been implemented in Brazil since 2012.⁽³³⁾ Studies conducted later have evaluated the sensitivity and specificity of these tests.^(4,5,8,34,35,36,37) However, the lack of a homogenous reference standard has caused the results of these studies to diverge, as each one has used a different criterion for defining infected cases.

With a reference standard in which dogs were considered negative when they had negative results in other serological tests for CVL and positive by the direct parasitological test in

bone marrow smear, TR-DPP had a sensitivity of 98% in symptomatic dogs.⁽³⁵⁾ In another study with asymptomatic and symptomatic dogs that used the immunohistochemical examination of skin biopsies as a reference, the accuracy for TR-DPP reached sensitivity levels of 82.1% (CI95% 73.7 to 88.4) and a specificity of 98.9% (CI95% 94.4 to 99.8).⁽³⁴⁾ Another study that used as a reference standard a combination of parasitological tests, including parasite cultures, conventional H&E histopathology, and immunohistochemical examination to assess TR-DPP showed a sensitivity of 88.0% (CI95% 67.5 to 96.8) and specificity of 69.2% (CI95% 63.7 to 74.3).⁽⁴⁾ A larger study, using the same reference standard, made subgroup analysis based on the presence of symptoms revealing that TR-DPP for asymptomatic dogs had a sensitivity of 75% (CI95% 42.8 to 94.5) and specificity of 72.9% (CI95% 68.5 to 77.1) compared to sensitivity of 93.8% (CI95% 82.8 to 98.7) and specificity of 56.4% (CI95% 46.2% to 66.3%) in symptomatic dogs.

⁽⁸⁾ Finally, DAT-*Canis* showed a sensitivity of 97% in symptomatic dogs,⁽²¹⁾ and its performance had not been previously assessed in diagnosing asymptomatic dogs.

Peixoto et al.⁽⁵⁾ performed a meta-analysis of test accuracy for CVL diagnosis, and they estimated a sensitivity of 83.5% (CI95% 78.3 to 87.9) and a specificity of 72.9% (CI95% 70.5 to 75.2) for TR-DPP and a sensitivity of 89% (CI95% 86.9 a 90.9) and specificity of 87% (CI95% 85.6 to 88.3) for the ELISA immunoenzymatic test with raw antigens. In that review, the heterogeneity was identified in the type of reference standard used in the studies that were included in the meta-analysis. The scarcity of studies with an asymptomatic dog population was also evident.⁽⁵⁾

A study that used only the parasitological diagnosis as a reference estimated a sensitivity of 46.2% for TRDPP and of 46.3% for EIE-LVC.⁽³⁷⁾ Another more recent study used the direct parasitological test associated with the parasite culture, and it estimated sensitivity for TRDPP of 100%; its specificity varied between 22 and 96%.

⁽³⁸⁾ The study by Silva et al.⁽³⁹⁾ used serological tests as a reference standard and the TR-DPP's sensitivity was 58.33% (CI95% 43 to 72). Carvalho et al.⁽¹⁰⁾ demonstrated that by using qPCR in blood serum samples, the protocol for CVL diagnosis prescribed by the Ministry of Health had a sensitivity of 67.24% (CI95% 54.42 to 77.92) and specificity of 86.59% (CI95% 77.55 to 92.34).

Nevertheless, it is valid to highlight that because of its higher sensitivity and lower costs, some researchers recommend EIE-LVC as a screening test and TR-DPP, due to its higher specificity, as a confirmatory test in the protocol for CVL diagnosis in Brazil.^(34,36) These recommendations are consistent with the results from the present study in which the sensitivity was higher when tests were analysed in that sequence.

In the context of the imperfection and heterogeneity of the tests used as a reference standard in the validation studies, an alternative would be the use of latent-class analysis to estimate indirectly the accuracy of tests, as Solcà et al.⁽⁴⁰⁾ did. In that study, the results for sensitivity for TR-DPP and EIE-LVC were 47.1% and 43.8%, respectively. Their data are substantially different from the accuracy studies that used other approaches for validation.⁽⁴⁰⁾

The difficulty in establishing a reference standard also resides in the lack of consensus on how to determine whether a dog is infected. Traditionally, serological tests were used as a reference to define the state of infection; however, there was the acknowledged lack of sensitivity. More recently, molecular techniques have allowed the detection of infection in animals that are seronegative. ^(14,17) This more sensitive form of detecting asymptomatic infection can contribute to better understanding of the dynamics of transmission and the lack of efficacy in the measures for CVL control that are currently based on the application of serological tests. That is a relevant point because these dogs, although asymptomatic, may act as

competent reservoirs. ^(15,16,17,18,19,20,41)

Similarly, the diagnosis of asymptomatic infection in humans is also challenging because the time between infection development and production of antibodies at detectable levels is not clear, providing room for molecular techniques for enhancing the early detection of infection. ^(42,43)

In a context in which the absence of a well-defined reference standard interferes with study results, this is the first study to use a composite reference standard that includes both conventional parasitological techniques and a combination of molecular tests in blood and bone marrow samples that can be obtained with relative ease.

With this composite reference standard, the accuracy results for the DAT-*Canis* test were similar to the those of other evaluated tests that have been used for routine CVL diagnosis in the visceral leishmaniasis control program in Brazil. Despite this similarity, the results for the accuracy values were inferior to those observed in previous studies. ^(5,8,21,44) The main difference between the present study and previous studies is at least partly caused by the type of reference standard used in each study. In this study, the introduction of very sensitive molecular tests applied to blood and bone marrow samples certainly contributed to the identification of 56.09% of the samples as positive. If the reference standard had simply involved the direct parasitological examination and culture of bone marrow, 17.07% of the samples would have been identified as positive. In that scenario, the sensitivity of DAT-*Canis* would have been estimated as 28.57% (CI95% 13.81 to 49.96) and its specificity as 91.18% (CI95% 84.08 to 95.29). A similar pattern is observed in the accuracy of other serological tests that were challenged against the reference standard used in this study. The problem of low sensitivity in the evaluated techniques is rather concerning because the reference standard used would still be open to enhancement with the inclusion of molecular diagnostics using skin tissue, which would probably hinder the performance of the evaluated serological tests even more. ⁽⁴⁵⁾

In the present study, it was not possible to establish the influence of symptomatology on test accuracy because most dogs were asymptomatic and because there was no significant difference in symptom score between the infected and non-infected groups. That difference in the detection capability for CVL in symptomatic and asymptomatic dogs was explored in other studies with different serological techniques. Paltrinieri et al. ⁽⁴⁶⁾ mentioned that the development of sensitivity for indirect immunofluorescence in detecting CVL is, on average, 90% for symptomatic animals and 29.4% in asymptomatic animals. In the work by Santarém et al. ⁽⁴⁷⁾ when using ELISA rK 39, the sensitivity was 88% in

symptomatic animals and 56% in asymptomatic ones. In other research, the Ministry of Health's protocol accuracy achieved a sensitivity of 95.24 (CI95% 77.33 to 99.15) and specificity of 61.11 (CI95% 38.62 to 79.69) in symptomatic dogs. In asymptomatic dogs, the sensitivity was

51.35 (CI95% 35.89 to 66.55), and the specificity was 93.75 (CI95% 85 to 97.54).⁽¹⁰⁾

These results reinforce the concerns with using serological tests to identify asymptomatic dogs, considering that serological diagnosis is the primary surveying tool for controlling CVL. Thus, it is possible that dogs that were screened and considered seronegative by serological protocols may have been infected, and they may have remained as a reservoir for a longer time without any intervention. As stated by Lopes et al.,⁽⁷⁾ one in every five seronegative dogs may have been infected, highlighting the concern that has been expressed by several authors regarding the real detection capacity of the tests currently in use by control programs.^(3,7,34,36)

The need for new diagnostic methods for surveys on dog populations that can discern both asymptomatic and symptomatic animals in an accurate way persists because that is a key element to defining the success or failure of CVL control.

The paradigms traditionally applied to diagnostic test validation for CVL are currently being challenged by molecular techniques and new knowledge on the role of these tests, and by their possible meanings in the context of the natural evolution of the infection or its prognosis after specific therapeutic interventions. Molecular tests are necessary to achieve a consensus on the reference standard for diagnosing the several stages of the canine disease. Attention is to be given to the results of molecular tests as infection markers for arthropod vectors in dogs because there are no easily verifiable markers for measuring that phenomenon. The molecular revolution has also affected the paradigms for diagnosing HVL. With more sensitive protocols, it is possible to diagnose patients in different stages of infection and in different types of clinical samples, including immunosuppressed patients who do not present detectable levels of antibodies in traditional serological tests.^(48,49)

The actual implication of our results for controlling visceral leishmaniasis and the application of extreme control measures such as dog culling should be further researched. It seems clear that in the near future such extreme measures will be abandoned because of its low acceptance by the affected communities and the ethical issues linked to appropriate animal care. In addition, newer control measures have been under evaluation such as insecticide-impregnated dog collars and preventive or therapeutic vaccines. For those interventions maintaining infected dogs in the community, careful monitoring of infection rates will be crucial for effectiveness evaluation, and our data showed that current serological tests will fail to detect most of the infected animals without clinical signs of visceral leishmaniasis. Finally, the infectiousness of asymptomatic dogs with positive results that were revealed exclusively through parasite DNA detection assays deserves special attention until proven to the contrary, it seems reasonable to consider those dogs as potential sources of infection.

Although the endemic area where the study was done had produced a small number of HVL cases, human infection seems to be of relevant magnitude.⁽⁵⁰⁾ The area has been

monitored and targeted with the traditional interventions recommended by the visceral leishmaniasis control program. Moreover, it would be useful to consider that the rapid dispersion of CVL across the continent brings the need of sensitive tests for early detection of such dispersion. Currently available serological tests could be inadequate for that purpose and improving sensitivity will be crucial for that setting.

With the results from the present study, we conclude that the low sensitivity in serological tests for diagnosing asymptomatic dogs must be considered one of the top concerns for controlling visceral leishmaniasis in Brazil. It seems advisable to suggest that the concern about the lack of test specificity for diagnosing CVL may not be as relevant as the low sensitivity, because the results herein suggest that the problems in specificity from other studies may have been determined by classification errors caused by imperfect reference standards that presented low sensitivity themselves.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the veterinarian Laurício Monteiro Cruz, the biologist Antonio Fonseca da Cunha Neto, and the team from the Directory for Environmental Surveillance of the Federal District for executing the TR-DPP and ELISA tests; we also thank the contribution from Ana Paula Sampaio Cardoso and Ana Claudia Negret Scalia for running the PCR assays; and the recombinant rK39 used in ELISA rK39 generously donated by Reed SG from the Infectious Disease Research Institute, Seattle, WA, USA.

AUTHORS' CONTRIBUTION

GASR, AR and AIPT provided an intellectual framework for the preparation of this study; AIPT and DMS collected the biological samples, conducted the PCR, culture, and parasitology experiments; TV, NN, BCC and MH performed the qPCR experiments; DO and EO conducted the DAT and ELISA rK39 serological tests. All authors contributed to data analysis and drafting the manuscript, and all have read and approved the final version.

REFERENCES

1. Sevá AP, Ovallos FG, Amaku M, Carrillo E, Moreno J, Galati EAB. Canine-based strategies for prevention and control of visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS One*. 2016; 11(7): e0160058.
2. Rocha MAN, Matos-Rocha TJ, Ribeiro CM, Abreu SR. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in state of Alagoas, Northeast, Brazil. *Braz J Biol*. 2018; 78(4): 609-14.
3. Romero GAS, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 19; 4(1): e584.
4. Schubach EYP, Figueiredo FB, Romero GAS. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014; 108: 568-74.
5. Peixoto HM, Oliveira MRF, Romero GAS. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. *Trop Med Int Health*. 2015; 20(3): 334-52.
6. Larson M, Toepp A, Scott B, Kurtz M, Fowler H. Semi-quantitative measurement of asymptomatic *L. infantum* infection and symptomatic visceral leishmaniasis in dogs using Dual-Path Platform CVL. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016; 101(1): 381-90.
7. Lopes EG, Sevá AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area : one out of five seronegative dogs are infected. *Epidemiol Infect*. 2017; 145(12): 2436-44.
8. Figueiredo FB, de Vasconcelos TCB, Madeira MF, Menezes RC, Maia-Elkhoury ANS, Marcelino AP, et al. Validation of Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP⁺ CVL rapid test) for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018; 113(11): e180260.
9. Paz GF, Rugani JMN, Marcelino AP, Gontijo CMF. Implications of the use of serological and molecular methods to detect infection by *Leishmania* spp. in urban pet dogs. *Acta Trop*. 2018; 182: 198-201.
10. Carvalho FLN, Riboldi EDO, Bello GL, Ramos RR, Barcellos RB, Gehlen M. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. *Epidemiol Infect*. 2018; 146(5): 571-6.
11. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasit Vectors* 2011; 4(1): 86-9.

12. Proverbio D, Spada E, Bagnagatti De Giorgi G, Perego R, Valena E. Relationship between *Leishmania* IFAT titer and clinicopathological manifestations (clinical score) in dogs. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 412808.
13. Gharbi M, Mhadhbi M, Rejeb A, Jaouadi K, Rouatbi M, Darghouth MA. Leishmaniasis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. *Rev Sci Tech*. 2015; 34(2): 613-26.
14. Torrecilha RBP, Utsunomiya YT, Bosco AM, Almeida BF, Pereira PP, Narciso LG. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. *Prev Vet Med*. 2016; 132: 83-7.
15. Soares MRA, de Mendonça IL, do Bonfim JM, Rodrigues JA, Werneck GL, Costa CHN. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Trop*. 2011; 117(1): 6-9.
16. Laurenti MD, Rossi CN, Matta VLR, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol*. 2013; 196(3-4): 296-300.
17. Borja LS, Sousa OMF, Solcà MS, Bastos LA, Bordoni M, Magalhães JT. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Vet Parasitol*. 2016; 229: 110-7.
18. Magalhães-Junior JT, Mota TF, Porfirio-Passos G, Lorangeira DF, Franke CR, Barrouin-Melo SM. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. *Vet Parasitol*. 2016; 223: 120-6.
19. Esteva L, Vargas C, Vargas de León C. The role of asymptomatics and dogs on leishmaniasis propagation. *Math Biosci*. 2017; 293: 46-55.
20. Zou L, Chen J, Ruan S. Modeling and analyzing the transmission dynamics of visceral leishmaniasis. *Math Biosci Eng*. 2017; 14(5): 1585-604.
21. Oliveira E, Saliba JW, Oliveira D, Dias ES, Paz GF. A prototype of the direct agglutination test kit (DAT-*Canis*) for the serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2016; 221: 9-13.
22. Faria AR, Pires SF, Reis AB, Coura-Vital W, Silveira JAG, Sousa GM. Canine visceral leishmaniasis follow-up: a new anti-IgG serological test more sensitive than ITS-1 conventional PCR. *Vet Parasitol*. 2017; 248: 62-7.
23. Dias DS, Ribeiro PAF, Salles BCS, Santos TTO, Ramos FF, Lage DP. Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. *Parasitol Int*. 2018; 67(3): 344-50.
24. Nogueira CT, Del Cistia ML, Urbaczek AC, Jusi MMG, Velásquez AMA, Machado RZ, et al. Potential application of rLc36 protein for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018; 113(3): 197-201.
25. Paiva-Cavalcanti M, Morais RCS, Pessoa-e-Silva R, TrajanoSilva LAM, Gonçalves-de-Albuquerque SC, Tavares DHC. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci*. 2015; 5(1): 31.
26. Boelaert M, Bhattacharya S, Chappuis F, El Safi S, Mondal D, Rijal S. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5: S30-S39.
27. Jain NC. *Schalm's veterinary hematology*. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1986.
28. Romero GAS, Sampaio RNR, Macêdo VO, Marsden PD. Sensitivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94(4): 505-8.
29. Ampuero J, Rios AP, Carranza-Tamayo CO, Romero GAS. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localised cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(7): 992-7.
30. Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schoönan G, Töz SO, Jaffe CL, et al. Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(1): e851.
31. Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BAS, Moreira OC, et al. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2012; 5(1): 15.
32. MS/SVS/DVE - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. 120 pp.
33. MS/SVS/DVDT - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Nota técnica conjunta 01/2011. Brasília: CGDT/CGLAB/ DVIT/ SVS/MS; 2011.
34. Laurenti MD, Leandro MVS, Tomokane TY, De Lucca HRL, Aschar M, Souza CSF. Comparative evaluation of the DPP CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2014; 205(3-4): 444-50.
35. Grimaldi G, Teva A, Ferreira AL, Santos CB, Pinto IS, Azevedo CT. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP[®]CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012; 106(1): 54-9.
36. Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Leal GGDA, Moreira NDD. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *PLoS One*. 2014; 9(3): 1-6.
37. Nunes CM, de Lima VMF, Paula HB, Perri SHV, Andrade AM, Dias FEF, et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral

- leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol.* 2008; 153(1-2): 19-23.
38. Mendonça IL, Batista JF, Schallig H, Cruz MSP, Alonso DP, Ribolla PEM. The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2017; 59(e39): 1-10.
 39. Silva RBS, Mendes RS, Santana VL, Souza HC, Ramos CPS, Souza AP. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. *Pesq Vet Bras.* 2016; 36(7): 625-9.
 40. Solcà MS, Bastos LA, Guedes CES, Bordoni M, Borja LS, Laranjeira DF. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. *PLoS One.* 2014; 9(7): e103635.
 41. Courtenay O, Carson C, Calvo-Bado L, Garcez R, Quinnell JR. Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(1): e2583.
 42. Sakkas H, Garzonika C, Levidiotou S. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis.* 2016; 53(1): 8-16.
 43. Medeiros FAC, Gomes LI, Oliveira E, Souza CSA, Mourão MV, Cota GF. Development and validation of a PCR-ELISA for the diagnosis of symptomatic and asymptomatic infection by *Leishmania (Leishmania) infantum*. *J Trop Med.* 2017; 7364854.
 44. Leal GGA, Carneiro M, Pinheiro AC, Marques LA, Ker HG, Reis AB. Risk profile for *Leishmania* infection in dogs coming from an area of visceral leishmaniasis reemergence. *Prev Vet Med.* 2018; 150: 1-7.
 45. Reis LE, Coura-Vital W, Roatt BM, Bouillet LÉ, Ker HG, Fortesde-Brito RC, et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Vet Parasitol.* 2013; 197(3-4): 498-503.
 46. Paltrinieri S, Gradoni L, Roura X, Zatelli A, Zini E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Vet Clin Pathol.* 2016; 45(4): 552-78.
 47. Santarém N, Silvestre R, Cardoso L, Schallig H, Reed SG, Cordeiro-da-Silva A. Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(5): 1866-74.
 48. Hailu T, Yimer M, Mulu W, Abera B. Challenges in visceral leishmaniasis control and elimination in the developing countries: a review. *J Vector Borne Dis.* 2016; 53(10): 193-8.
 49. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mol Diagn Ther.* 2018; 22: 443.
 50. Carranza-Tamayo CO, Werneck GL, Romero GAS. Are opossums a relevant factor associated with asymptomatic *Leishmania* infection in the outskirts of the largest Brazilian cities? *Braz J Infect Dis.* 2016; 20(2): 119-26.

Anexo I: Localização Fercal e APA Cafuringa

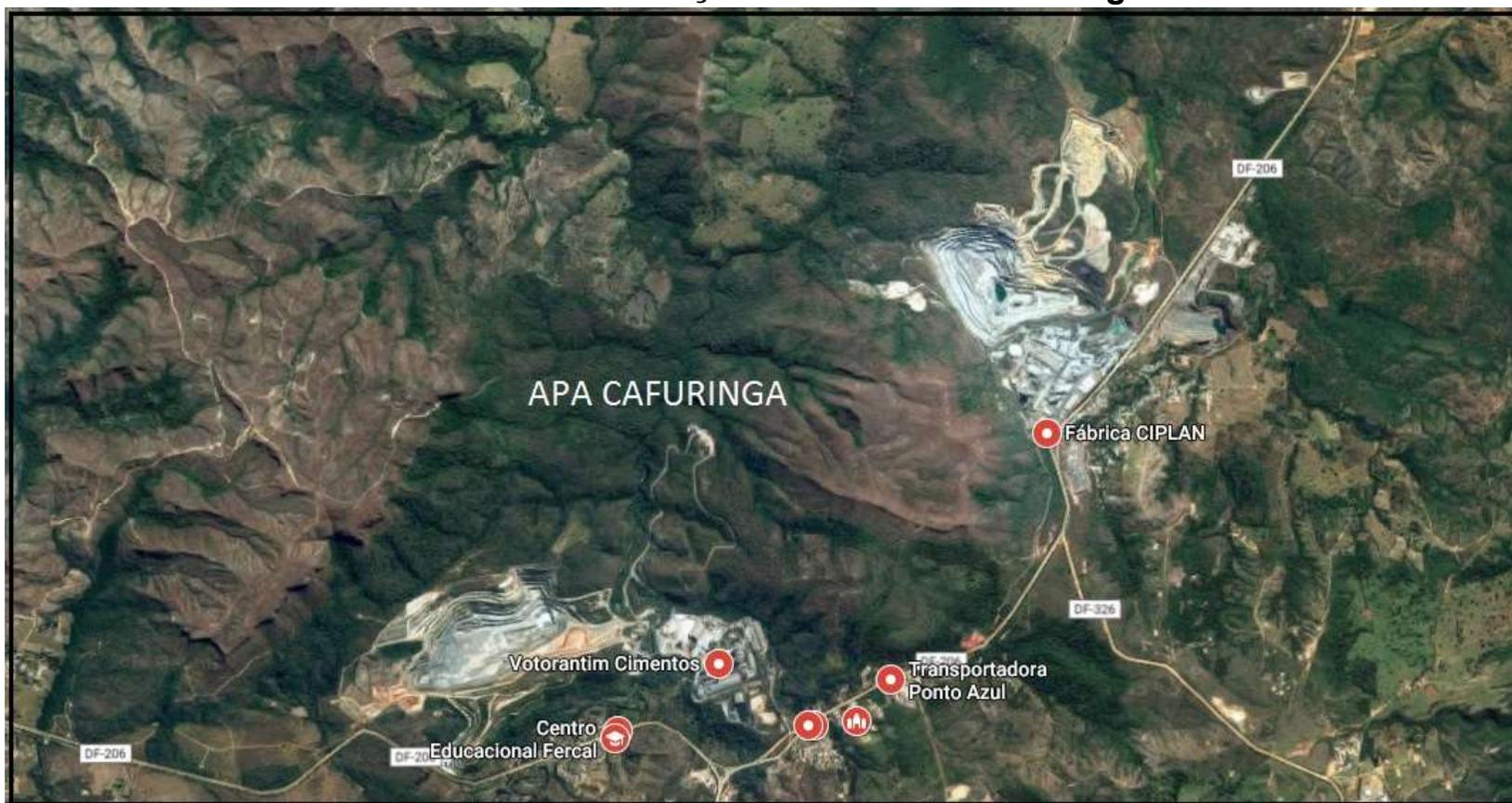


Imagem de satélite obtida via Google Earth indicando as indústrias de cimento e a APA Cafuringa

Anexo II: Certificado CEUA



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 19 de novembro de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "RISCO, DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.", UnBDoC n.º 11253/2015, sob responsabilidade do Professor Gustavo Adolfo Sierra Romero foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de Canis familiares: 1000. A presente aprovação é válida pelo período de 9/2/2015 a 31/7/2019.



Profa. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.