



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

CAMILA ZOMER SPINDOLA

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: SOROPREVALÊNCIA E
GEORREFERENCIAMENTO NO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Anderson Barbosa de Moura

LAGES, SC
2023

À minha querida família, que tanto
admiro, dedico o resultado do esforço
deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

É chegado o momento de agradecer a todos (as) que de alguma forma fizeram deste trabalho uma realidade. São inúmeras as pessoas que, direta ou indiretamente, ao longo destes quatro anos contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha família por todo o apoio. De todas as formas vocês foram cruciais para que eu tivesse forças e conseguisse concluir mais esta etapa de minha vida. Este doutorado também é de vocês!

Ao professor Mauro Maciel de Arruda deixo aqui meus mais sinceros e estimados agradecimentos. Muito obrigada professor por ter confiado em minha capacidade, por tantas vezes ter me acalmado, falando que tudo iria dar certo, mesmo parecendo que não havia mais solução.

Ao professor Anderson Barbosa de Moura agradeço pela oportunidade em poder cursar este doutorado, pela confiança depositada e pela dedicação em me auxiliar nesta caminhada! Da mesma forma agradeço à UDESC e à equipe do Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do CAV/UDESC pelo apoio prestado ao longo deste período.

Não poderia deixar de agradecer ao professor Fabiano Borges Figueiredo e à FIOCRUZ por todo o apoio com o projeto desde as fases iniciais. Que continuemos tendo em nosso país profissionais dedicados à saúde pública assim como você!

Agradeço ao professor Guilherme Valente de Souza que também faz parte desta conquista! Sempre irei lembrar de todo o apoio prestado em nome da Unibave, instituição que sempre me acolheu e tornou possível a execução deste projeto. Se hoje colho os frutos é porque um dia alguém acreditou no meu potencial e nunca me deixou desistir! Obrigada professor!

Ao longo destes quatro anos de doutorado, tive a oportunidade de viajar por todo o estado de Santa Catarina coletando as 1.227 amostras de sangue e, junto a isso, conheci pessoas que me auxiliaram das mais diversas formas. Tentando não esquecer de ninguém, irei listar (como prometido) o nome destas pessoas e instituições que me auxiliaram. Agradeço a confiança em nos deixar entrar em suas casas e clínicas, por responder as mensagens, acreditar em nosso objetivo, cedendo a autorização para as coletas de seus animais. Mesmo em se tratando de um tema tão sensível como é a leishmaniose visceral canina, nunca irei esquecer dos esforços de inúmeras pessoas que abraçaram esta causa e se disponibilizaram, em meio às suas tarefas diárias, em nos ajudar para que pudéssemos concluir nossa façanha.

A todos (as) deixo aqui gravado meu muito obrigada!
MCA Pet na pessoa de André Freccia (Tubarão/SC); UVZ de Tubarão/SC na pessoa de Gabriela Martins; Clínica Veterinária Bett (Orleans/SC) nas pessoas de Eveline Nazário Baschiroto e Francisco Bett Bussolo; Della Vet Clínica Veterinária (Orleans/SC) na pessoa de Érica Della Giustina; Clínica Veterinária Saúde Animal de São Joaquim/SC; Hospital de Clínicas Veterinárias Professor Lauro Ribas Zimmer do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV/UDESC) de Lages/SC; Professora Mere Erika Saito do Setor de Patologia Clínica Veterinária (CAV/UDESC); Deise Hemckmeier (Médica Veterinária de Bom Retiro/SC); Clínica Veterinária Esterilize (Paulo Lopes/SC); Hospital

Veterinário Unibave na pessoa de Livia Gonçalves da Silva Valente (Orleans/SC); Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária do Unibave pelo auxílio nas coletas; Rodrigo Pivatto do Instituto Federal Catarinense (Concórdia/SC); Clínica Veterinária Vida Animal (Santo Amaro da Imperatriz/SC); Clínica Veterinária Animalia (Imbituba/SC); Médico Veterinário Mateus Eloir Gabriel (Concórdia/SC); ONG Amparo Animal (Chapecó/SC); UVZ de Lages/SC na pessoa dos Médicos Veterinários Geanice Ledo, Tiago e Jhenifer; Médicos Veterinários Jéssica Aline Whithoeff e Leonardo Silva da Costa; Clínica Veterinária Amigo Fiel (Curitibanos/SC) na pessoa de Rodrigo Cezar; Willian Kayda do HCV/CAV/UDESC (Lages/SC); Lina Maria Salazar Echeverri; Médica Veterinária Márcia Sangaletti Lavina; Ivone Lemos e Maridélia da ONG de Tijucas/SC; Médica Veterinária Adriana Hauser Lengert (Itapiranga/SC); Clínica Veterinária Erê Pet na pessoa de Ana Maria Steffen de Lima e ONG Amigo Bicho (Campo Erê/SC); Médico Veterinário Jaime de Matos Junior da Secretaria de Saúde e Vigilância Ambiental da Prefeitura Municipal de Joinville/SC; Médica Veterinária Tais Cardozo (Araranguá/SC); Secretário Municipal de Saúde Vilson José Porcíncula e Idarleni Darosci, do Setor de Vigilância em Saúde do Município de Tijucas/SC; Aline Cristiane Borba Monteiro da Vigilância Epidemiológica e do Programa de Controle de Zoonoses do Município de Jaraguá do Sul/SC; José Edson Rodrigues da Secretaria Municipal de Agricultura de Jaraguá do Sul/SC; Médica Veterinária Marta Morês da Clínica Veterinária Auquemia (Joaçaba/SC); Jackson Oscar Michaut do Laboratório São Francisco (Joaçaba/SC); Eloisa Helena Oronha (Campos Novos/SC); Médica Veterinária Nicole Melo Foster da Clínica Veterinária Meu Pet (Barra Velha/SC); Associação Protetora dos Animais de São Bento do Sul/SC; Silvana Furini (Dionísio Cerqueira/SC); ONG Amigo Bicho de São Miguel do Oeste/SC, em especial à Eliane; Simone da Regional de Saúde de São Miguel do Oeste/SC; Médico Veterinário Edson Radünz da UVZ de Canoinhas/SC; Janaina da Regional de Saúde de Mafra/SC; Mirian Clara Schloegl da ONG Amigo Fiel/Clube Ecológico Canforeira de Mafra/SC; Maurício Sezerino (motorista do CAV/UDESC); CEPREAD de Blumenau/SC; às senhoras Ursula, Claudete, Ingrid e Evelina de Blumenau/SC; Equipe do Sítio Dona Lúcia de Blumenau/SC; Médica Veterinária Tainá Luana Vieira Lopes Zuchi da Clínica Veterinária Pet Life (Concórdia/SC); Médica Veterinária Ana Paula Castro; Equipe do DIBEA de Florianópolis/SC; Médica Veterinária Monique Paiva de Campos do Instituto Carlos Chagas (ICC-FIOCRUZ) Curitiba/PR; Médica Veterinária Aysla Matsumoto da DIVE/SC; João Augusto Brancher Fuck, Diretor da DIVE/SC; Médico Veterinário Artur Augusto Mendes Velho Junior do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos INI/FIOCRUZ; Miriam Sant'Anna Ghazzi do Laboratório de Entomologia da DIVE/SC; Centro Veterinário Dr. Nathan (Rio do Sul/SC); Clínica Veterinária Pet Rio (Rio do Sul/SC); Leonardo Josoe Biffi do Departamento de Engenharia Ambiental e Sanitária CAV/UDESC.

Agradeço ainda aos queridos amigos Natã Medeiros Godinho e Carla Dezan de Lorenzi Cancelier por terem sido minha salvação em tantos momentos. Obrigada!

Não menos importante, agradeço ao PROGRAMA UNIEDU/FUMDES PÓS-GRADUAÇÃO pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa

e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) por meio do Edital de Chamada Pública 027/2020 - Termo de Outorga: 2021TR793.

RESUMO

Durante muito tempo, a leishmaniose visceral canina (LVC) foi considerada uma enfermidade endêmica das regiões Norte e Nordeste do Brasil, enquanto a região Sul do país permanecia indene. Porém, nos últimos anos, vários casos de LVC têm sido notificados nos estados da região Sul. O objetivo deste trabalho foi determinar a soroprevalência da LVC em cães, por meio dos testes imunocromatográfico (DPP®) e ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e sua correlação com as características ambientais, por meio do georreferenciamento, a epidemiologia dos casos positivos, assim como as lesões anatomohistopatológicas de casos diagnosticados no estado de Santa Catarina nos anos de 2019, 2020 e 2021. Amostras de sangue de cães (n=1227) foram coletadas em todas as mesorregiões do estado e submetidas ao teste rápido (DPP®) para LVC. As amostras positivas foram enviadas ao Lacen (Laboratório Central de Saúde Pública) de Santa Catarina para confirmação pelo método ELISA. Quatro animais foram necropsiados e amostras de órgãos foram coletadas e enviadas para análise pela reação em cadeia da polimerase (PCR), imuno-histoquímica e histopatologia. As informações obtidas por meio do questionário epidemiológico forneceram dados que posteriormente foram submetidos aos métodos estatísticos com suas correlações, assim como o endereço de cada coleta proporcionou a criação de mapas utilizando a técnica de georreferenciamento e a criação de mapas de calor (Método de Kernel). Dos 1.227 cães coletados, 22 (1,8%) foram positivos no teste de triagem DPP® e destes, sete (0,6%) foram confirmados pelo método ELISA. Correlação ($P<0,01$) foi observada entre positividade e as variáveis ambiente e sinais clínicos em ambos os testes. De acordo com o georreferenciamento, ficou evidente que os casos positivos em ambas as técnicas, utilizadas para o diagnóstico, se concentraram na região da Faixa Leste do estado, em áreas de baixas altitudes, com índice pluviométrico médio, de temperatura média mais elevada e em áreas mais populosas e próximas a fragmentos florestais. A PCR, a histopatologia e a imuno-histoquímica, em consonância à sorologia, demonstraram-se eficientes na caracterização dos casos positivos, assim como o emprego do georreferenciamento proporcionou a espacialização dos casos e a distribuição deles no Estado.

Palavras-chave: *Leishmania* spp. Georreferenciamento. Saúde Pública. Zoonose.

ABSTRACT

For a long time, canine visceral leishmaniasis (CVL) was considered an endemic disease in the North and Northeast regions of Brazil, while the Southern region of the country remained unaffected. However, in recent years, several cases of CVL have been reported in the states of the Southern region. The objective of this work was to determine the seroprevalence of CVL in dogs, through immunochromatographic tests (DPP®) and ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) and its correlation with environmental characteristics, through georeferencing, describing the epidemiology of positive cases, as well as the histopathological lesions of cases diagnosed in the state of Santa Catarina in the years 2019, 2020 and 2021. Blood samples from dogs (n=1227) were collected in all mesoregions of the state and submitted to the rapid test (DPP®) for CVL. The positive samples were sent to Lacen (Central Public Health Laboratory) in Santa Catarina for confirmation by the ELISA method. Four animals were necropsied and organ samples were collected and sent for analysis by polymerase chain reaction (PCR), immunohistochemistry and histopathology. The information obtained through the epidemiological questionnaire provided data that were subsequently submitted to statistical methods with their correlations, as well as the address of each collection provided the creation of maps using the georeferencing technique and the creation of heat maps (Kernel Method). Of the 1.227 dogs collected, 22 (1,8%) were positive in the DPP® screening test and of these, seven (0.6%) were confirmed by the ELISA method. Correlation ($P<0.01$) was observed between positivity and the variables environment and clinical signs in both tests. According to the georeferencing, it was evident that the positive cases in both techniques, used for the diagnosis, were concentrated in the East Belt region of the state, in areas of low altitudes, with average rainfall, with higher average temperature and in more populated areas and close to forest fragments. PCR, histopathology and immunohistochemistry, in line with serology, proved to be efficient in the characterization of positive cases, as well as the use of georeferencing provided the spatialization of cases and their distribution in the State.

Keywords: *Leishmania spp.* Georeferencing. Public health. Zoonosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de <i>Leishmania</i> spp.	28
Figura 2 - Classificação taxonômica atual das espécies de <i>Leishmania</i> considerando fatores extrínsecos e métodos moleculares e bioquímicos.....	31
Figura 3 - Dispositivo de teste DPP® (Dual Path Platform) Bio-Manguinhos ..	43
Figura 4 - Mesorregiões do Estado de Santa Catarina.....	53
Figura 5 - Fórmula para obtenção do número de amostras em uma população considerada infinita.	55
Figura 6 - Teste DPP positivo (A) e negativo (B).....	56
Figura 7 - Mapa das principais rodovias que cruzam o estado de Santa Catarina.	63
Figura 8 - Mapa de Santa Catarina destacando os municípios em que ocorreram coletas de sangue e as principais rodovias do Estado.....	64
Figura 9 - Representação dos locais de coleta, cidades com casos positivos no DPP® e no ELISA de acordo com as principais rodovias do estado.....	74
Figura 10 - Representação utilizando o método de Kernel para as coletas positivas ao método DPP® no estado.....	75
Figura 11 - Representação utilizando o método de Kernel para as coletas positivas ao método ELISA no estado.....	76
Figura 12 - Representação utilizando o método de Georreferenciamento para a altimetria no estado de Santa Catarina no ano de 2020 e correlação com os casos DPP e ELISA positivos.....	77
Figura 13 - Representação utilizando o método de Georreferenciamento para a pluviometria no Estado de Santa Catarina no ano de 2020 e correlação com os casos DPP e ELISA positivos.....	78
Figura 14 - Representação utilizando o método de Georreferenciamento para a temperatura média no Estado de Santa Catarina no ano de 2020 e correlação com os casos DPP e ELISA positivos.	79
Figura 15 - Representação utilizando o método de Georreferenciamento para uso e cobertura do solo no Estado de Santa Catarina no ano de 2020 e correlação com os casos DPP e ELISA positivos.	80
Figura 16 - Animal 3 apresentando caquexia, alopecia, onicogrifose e lesões de pele em diversos graus (Rio do Sul).	85

Figura 17 - Animal 2 apresentando descamação furfurácea da pele e emagrecimento (Palhoça).	85
Figura 18 - Animal 1 apresentando lesões de pele e onicogribose (Cocal do Sul).	86
Figura 19 - Animal 4 apresentando descamação furfurácea da pele (Orleans).	86
Figura 1 - Fotomicrografias de baço, fígado e linfonodo nas técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica de cães positivos para LVC.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Porcentagem das variáveis de acordo com os testes DPP® e ELISA para leishmaniose visceral canina no Estado de Santa Catarina, 2022. 67

Tabela 2 - Correlações estatísticas das variáveis de acordo com os testes DPP® e ELISA para leishmaniose visceral canina no Estado de Santa Catarina, 2022.
..... 72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Distribuição amostral de acordo com as seis mesorregiões do estado de Santa Catarina.	62
Quadro 2: Distribuição amostral de acordo com os municípios do estado de Santa Catarina.	64
Quadro 3 - Números de casos positivos e negativos no DPP® e no Elisa nos municípios do estado de Santa Catarina (N=1227), assim como casos positivos nas técnicas de PCR, histopatologia e imuno-histoquímica.	70
Quadro 4 - Descrição das lesões de necropsia de 4 cães positivos nas técnicas DPP®/ELISA.	89
Quadro 5 - Resultados das técnicas de Histopatologia e Imunohistoquímica dos cães positivos para LVC.	90
Quadro 6: Resultado da técnica de PCR para <i>Leishmania infantum</i> em 4 cães positivos nas técnicas DPP/ELISA.	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aC – Antes de Cristo

AFLP - Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado

BR – Rodovia Federal

CAV – Centro de Ciências Agroveterinárias

CEUA – Comissão de Ética em Uso de Animais

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPP – Dual Path Plataforma

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid.

EIE – Ensaio Imuno Enzimático

ELISA – Enzyme Linked Imuno Sorbent Assay

EUA – Estados Unidos da América

gEq – Equivalente genômico

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICC – Instituto Carlos Chagas

IFI – Imunofluorescência Indireta

IFN γ – Interferon Gama

IgG – Imunoglobulina G

IL 4 – Interleucina 4

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública

LAMP - Amplificação isotérmica mediada por loop

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

LVH – Leishmaniose Visceral Humana

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MLEE - Eletroforese de enzima multilocus

NASBA - Amplificação baseada em sequência de ácido nucleico

Nested PCR – PCR aninhado

NNN – Neal, Novy, Nicolle

OC – PCR - PCR por oligo-cromatografia

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONGs – Organizações Não-Governamentais

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

PBS - Phosphate Buffered Saline

PCLV – Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

PCR – Polymerase Chain Reaction

PCR Multiplex – PCR múltiplo

pH – potencial de hidrogênio

PR – Paraná

q PCR – PCR em Tempo Real ou PCR quantitativo

RAPD-PCR - DNA polimórfico amplificado aleatoriamente

TH1 – linfócitos TH1

TH2 – linfócitos TH2

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

TR DPP – Teste Rápido Dual Path Plataform

UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina

UNIBAVE – Centro Universitário Barriga Verde

UVZ – Unidade de Vigilância de Zoonoses

WHO – World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

mg – Miligrama

Kg – Kilograma

h – Horas

mm – Milímetro

® - Marca registrada

°C – Graus Celsius

mL – Microlitros

™ – marca não registrada

– – negativo

+ – positivo

% – Porcentagem

: – Proporção

> – maior que

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 LEISHMANIOSES.....	20
2.2 LEISHMANIOSE VISCERAL	21
2.2.1 No ser humano.....	22
2.2.2 No cão.....	23
2.3 AGENTE ETIOLÓGICO	26
2.4 VETOR DA LEISHMANIOSE VISCERAL	33
2.5 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	35
2.6 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	44
2.7 CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	46
2.8 GEORREFERENCIAMENTO.....	49
3 OBJETIVOS	52
3.1 OBJETIVO GERAL	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1 AMOSTRAS.....	53
4.2 LOCAL DA PESQUISA	54
4.3 ESTIMATIVA DA POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM	55
4.4 REALIZAÇÃO DOS TESTES DE TRIAGEM DPP® E CONFIRMAÇÃO PELO MÉTODO ELISA.....	55
4.5 REALIZAÇÃO DE NECROPSIA, TÉCNICAS DE PCR, HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS CASOS POSITIVOS.....	57
4.7 CORRELAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS	60
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	REATIVIDADE AO TESTE DPP®, ELISA E CORRELAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS.....	62
5.2	ANATOMOPATOLOGIA, TÉCNICAS DE PCR, HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS CASOS POSITIVOS	88
5.3	CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS E DO AMBIENTE ONDE FORAM REALIZADAS AS COLETAS	95
5.4	FLEBOTOMÍNEOS	96
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
8	CONCLUSÕES	99
9	REFERÊNCIAS.....	100
ANEXO I.....		130
ANEXO II.....		136
ANEXO III.....		141
ANEXO IV		143

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses formam um complexo de doenças distintas, com apresentação visceral, cutânea e mucocutânea, transmitidas por vetores e que possuem caráter endêmico em diversas regiões do planeta (HERWALDT, 1999). A forma visceral da doença (leishmaniose visceral ou LV) é a mais preocupante e, sem tratamento, pode ser fatal (DESJEUX, 2004).

Grande parte dos casos de LV ocorrem nos países da África Oriental, na Índia e no Brasil. Anualmente, estima-se que ocorram de 50.000 a 90.000 novos casos da doença em todo o mundo, onde apenas 25 a 45% são relatados à OMS, tornando a LV uma das principais doenças parasitárias com potencial de provocar surtos e com altas taxas de mortalidade (WHO, 2021).

A doença é causada por um protozoário intracelular do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), especificamente *Leishmania infantum* (KUHLS et al., 2011). Por questões de nomenclatura, no Novo Mundo a espécie *L. chagasi* é considerada sinônimo de *L. infantum* (OPS/OMS, 2019). Estes protozoários possuem ciclo heteroxênico, ou seja, necessitam de dois hospedeiros, sendo um vertebrado, representado principalmente por canídeos silvestres e domésticos, e de um invertebrado, o inseto vetor (LAINSON, SHAW; LINS, 1969; SCHLEIN, 1993).

Dentre os hospedeiros vertebrados silvestres destacam-se ainda os mamíferos das ordens Rodentia, Marsupialia e Carnivora (DANTAS-TORRES, 2007), sendo que no ambiente doméstico os cães atuam como importantes reservatórios da doença aos seres humanos (MAIA; CAMPINO, 2018).

O principal vetor envolvido com a transmissão da leishmaniose visceral no Novo Mundo é *Lutzomyia longipalpis* (PECH-MAY et al., 2018) e no Brasil, implicou-se a participação de *Lutzomyia cruzi* (MISSAWA et al., 2011), *Lutzomyia almerio* e *Lutzomyia salesi* (OPS/OMS, 2019).

Estes insetos, denominados flebotomíneos, são conhecidos por diversos nomes populares, tais como mosquito palha, birigui, tatuquira, entre outros. São pequenos, medindo em torno de 1 a 3 mm de comprimento, de coloração clara, depositam seus ovos em matéria orgânica, voam em pequenos saltos e apresentam hábitos crepusculares e noturnos (BRASIL, 2014).

Em relação ao ciclo da leishmaniose, no hospedeiro vertebrado o estágio encontrado é a forma amastigota. Quando realizam o repasto sanguíneo em um animal infectado, os flebotomíneos podem ingerir macrófagos repletos destas formas, que se diferenciam em promastigotas. Em grande quantidade, estas promastigotas migram para a faringe do flebotomíneo e em alguns dias atingem o hipostômio. Essa localização impede o flebotomíneo de se alimentar normalmente, o que o obriga a procurar um número maior de hospedeiros para o repasto sanguíneo. As formas promastigotas serão então fagocitadas pelos macrófagos e carregadas pelo organismo do hospedeiro, que pode gerar o quadro clínico da doença (BOWMAN, 2010).

No Brasil, como diagnóstico oficial, o Ministério da Saúde preconiza o teste imunocromatográfico rápido (DPP®) como teste de triagem e o ensaio imunoenzimático (ELISA) como teste confirmatório, sendo que anteriormente se utilizavam o ELISA como teste de triagem e a RIFI (reação de imunofluorescência indireta) como teste confirmatório (ARRUDA et al., 2016). O uso de duas técnicas sorológicas associadas tem por objetivo aumentar a sensibilidade dos testes, não indicando necessariamente diminuição de eficácia dos mesmos, até porque os testes sorológicos são considerados excelentes ferramentas de diagnóstico (LÉVÊQUE et al., 2020).

Algo preocupante e que vem sendo observado nos últimos anos é que a leishmaniose visceral canina (LVC) tem sofrido mudanças em seus padrões epidemiológicos, se caracterizando como uma doença em franco processo de expansão e urbanização (FIGUEIREDO et al., 2010), se já não urbanizada (MONTEIRO et al., 2005). A ocorrência de casos humanos e o grande número de cães positivos em várias cidades de médio e grande porte acendem um alerta para a alteração na natureza de ocorrência da doença, que passa do ambiente silvestre e zonas rurais para os centros urbanos (GONTIJO; MELO, 2004).

Em muitos lugares, os fluxos migratórios e a ocupação urbana desordenada das cidades, associados a construções de rodovias e grandes obras são fatores que possibilitam a disseminação da LVC (PATZ et al., 2004), tais como ocorre nos estados brasileiros do Mato Grosso (MESTRE; FONTES, 2007), Minas Gerais (MENEZES et al., 2015) São Paulo (MATSUMOTO; CASAGRANDE; GUIMARÃES, 2013; CARDIM et al., 2016) e Paraná (PASQUALI et al., 2019).

No estado de Santa Catarina o relato dos primeiros casos autóctones de LVC ocorreu no ano de 2012 em Florianópolis (FIGUEIREDO et al., 2012), assim como o primeiro surto autóctone, no ano de 2013, no mesmo município (STEINDEL et al., 2013). Em relação aos relatos da doença em humanos no estado, o primeiro caso autóctone ocorreu em Florianópolis no ano de 2017 (SANTA CATARINA, 2017), comprovando que os casos caninos de leishmaniose visceral precedem os casos humanos (WERNECK et al., 2007).

Diante do cenário da expansão da LV e da LVC no estado de Santa Catarina, o objetivo deste trabalho foi determinar a soroprevalência da LVC em cães no estado de Santa Catarina, por meio dos testes imunocromatográfico (DPP®), como triagem, e ELISA, como confirmatório, de acordo com o Programa Nacional de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Além disso, objetiva-se correlacionar estes dados de soroprevalência com as características ambientais, por meio do georreferenciamento, e descrever a epidemiologia e os achados anatomohistopatológicos dos casos diagnosticados no estado de Santa Catarina nos anos de 2019, 2020 e 2021.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEISHMANIOSES

De transmissão vetorial, as leishmanioses compreendem um grupo de doenças infecciosas negligenciadas, sendo frequentemente registradas em países pobres onde atingem populações mais vulneráveis e com acesso limitado aos serviços de saúde, tal como ocorre nos países da África, Ásia e nas Américas, locais onde se concentram a maioria dos casos (OPS/OMS, 2019). Em humanos a doença pode ser dividida em três formas distintas, a saber: leishmaniose visceral, cutânea e muco cutânea, podendo ocorrer variações (PEARSON; SOUSA, 1996).

Na forma cutânea a patologia é determinada tanto pela espécie de *Leishmania* infectante, como pelo tipo de resposta inflamatória e anti-inflamatória do sistema imune do hospedeiro, o que leva às diversas formas clínicas apresentadas (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Conhecida também como “ferida oriental”, esta forma de leishmaniose inicia com uma pequena lesão no local da picada do inseto vetor, podendo aumentar gradualmente de tamanho até se transformar em um granuloma ou em uma ferida grande, aberta e úmida (ASHFORD, 2000).

Em se tratando da leishmaniose muco cutânea, a doença se manifesta nas mucosas das vias respiratórias como um granuloma que afeta o septo nasal, podendo atingir a faringe, palato, laringe e lábios (MARSDEN, 1986). Suas lesões são altamente desfigurantes (STRAZZULA et al., 2013), levando à estigma social e repercussões psicológicas (HANDLER et al., 2015).

A LV, conhecida como “kala-azar” na Índia, é considerada uma das principais causas de morte em países subdesenvolvidos (GUERIN et al., 2002). É caracterizada como uma doença sistêmica grave e altamente fatal, caso não seja devidamente diagnosticada e tratada (OPS/OMS, 2019). Segundo Alvar et al. (2012) mais de 90% dos casos mundiais de leishmaniose visceral ocorrem na Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil.

Desta forma, considerando-se que o complexo de doenças das leishmanioses faz parte do grupo de doenças tropicais negligenciadas, os esforços para medidas de controle, tratamento e formas de prevenção devem ser prioridades em programas de saúde nos países mais acometidos (ALVAR;

YACTAYO; BERN, 2006). Por ser uma doença que acomete principalmente populações vulneráveis (OKWOR; UZZONA, 2016), a utilização da educação em saúde é uma forma de se alcançar a conscientização e, conseqüentemente, o controle da doença (GOUVEIA et al., 2012; TEODORO et al., 2014).

2.2 LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV é conhecida desde o ano de 1835, na Grécia, quando foi denominada “ponos” ou “hapoplinakon”. Em 1869, na Índia, recebeu o nome de “Kala-jwar” o qual quer dizer febre negra ou “kala-azar” que significa pele negra, em virtude do discreto aumento da pigmentação epitelial que ocorria durante a doença. O agente etiológico só foi descoberto quase que simultaneamente por Leishman e Donovan em 1903. O cão teve sua importância como reservatório doméstico descrita pela primeira vez por Nicolle, na Tunísia, em 1908 (MARZOCHI et al., 1981).

Mesmo antes de 1835 a doença já era conhecida em diversas regiões da Índia, como uma enfermidade que se espalhou pelos povoados e dizimou quase que totalmente a população dos locais acometidos. O quadro clínico geralmente era caracterizado por uma febre com recaídas, emagrecimento progressivo, hepato e esplenomegalia, além de complicações diversas (SENGUPTA, 1947).

No Brasil, Carlos Chagas, percorrendo o vale do Rio Amazonas, suspeitou da existência da doença nos anos de 1911 e 1912 por encontrar pacientes com esplenomegalia sem causa justificada. O primeiro relato da doença nas Américas foi feito por Migone, em 1913 em um paciente que teve a forma letal da doença em Assunção, no Paraguai, mas que contraiu a doença no estado do Mato Grosso, no Brasil (CHAGAS et al., 1937).

O pesquisador Evandro Chagas foi o responsável pela investigação de uma nova doença descrita pelo patologista Henrique Penna em amostras de pacientes da região Norte e Nordeste do Brasil nos anos 30. A partir das pesquisas sobre leishmanioses, estimulou-se a criação de diversos centros de estudo pelo país, como o Instituto de Patologia do Norte (IPEN) e Instituto Evandro Chagas (Belém/Pará), Instituto de Medicina Preventiva do Ceará

(Fortaleza), Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (Salvador/Bahia), Centro de Pesquisas René Rachou (Belo Horizonte/Minas Gerais) e o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Recife/Pernambuco) (BENCHIMOL et al., 2019).

Em todo o mundo, a leishmaniose é uma doença que ainda acomete as populações mais pobres, sendo registrada principalmente em vilas rurais remotas e com moradias precárias, acometendo as pessoas com menos acesso à saúde (OKWOR; UZZONA, 2016). Nos países onde é endêmica, a doença continua sendo negligenciada cabendo ao setor público investimentos em controle e estudos de novas drogas e métodos diagnósticos eficientes, apesar dos recursos escassos e infraestrutura inadequada (GONTIJO; MELO, 2004).

2.2.1 No ser humano

Leishmaniose visceral é uma doença zoonótica de caráter endêmico na América Latina, ocorrendo em 12 países que abrigam 96% dos casos, entre eles o Brasil. Nos últimos anos tem acometido mais frequentemente crianças e adultos jovens de áreas urbanizadas, se sobrepondo, muitas vezes, à indivíduos que convivem com o HIV (vírus da imunodeficiência humana) (LINDOSO et al., 2014).

A urbanização da doença ocorreu devido às constantes modificações do ambiente, tais como pressão econômica, processos migratórios, êxodo rural e desmatamento, aliados à pobreza e à adaptação do vetor em ambientes peridomiciliares (UCHÔA et al., 2001; SANTOS et al., 2005; BRASIL, 2014).

O quadro clínico inicia com febre irregular, indisposição e diarreia, evoluindo para episódios de febre alta, anemia, hepatomegalia e esplenomegalia, culminando com um quadro caquetizante progressivo. A caquexia permanece de forma crônica e associada à deficiência miocárdica, congestão visceral e ascite, podendo evoluir para a morte (CHAGAS et al., 1938).

O diagnóstico é complexo, pois a sintomatologia é semelhante ao que ocorre em outras doenças, tais como malária, febre tifoide e tuberculose. As técnicas diagnósticas mais utilizadas incluem identificação do parasita e/ou detecção do DNA em amostras de tecido, cultura in vitro e/ou inoculação em animais e técnicas de imunodiagnóstico (SUNDAR; RAI, 2002).

Existem medicamentos e candidatos a vacinas disponíveis para tratar ou prevenir a leishmaniose, porém a maioria das ferramentas terapêuticas não se mostra eficiente para erradicar a doença (GHORBANIE; FARHOUDI, 2018; SOUSA-PAULA; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2020).

2.2.2 No cão

LV é considerada uma zoonose sendo os cães os principais reservatórios da doença em meio urbano (BRAGA et al., 1986). Os casos da doença em humanos estão intimamente associados à taxa de infecção nos cães. O controle da doença canina contribui para a redução dos casos em humanos (BEVILACQUA et al., 2001; COSTA et al., 2020).

Levando-se em consideração os ambientes das cidades, cães errantes ou que vivem em abrigos de animais podem apresentar as maiores prevalências em relação aos cães domiciliados (NAVEDA et al., 2006; SHOKRI; FAKHAR; TESHNIZI, 2017; PARKER et al., 2021). Moreno & Alvar (2002) relatam que cães de rua podem estar associados a um ciclo “peridoméstico” devido a uma condição de sinantropia progressiva (associação com humanos e suas moradias).

Animais infectados por *Leishmania infantum* podem apresentar uma variabilidade enorme de formas clínicas e patológicas, muitas delas consideradas atípicas, tais como o acometimento do sistema nervoso central (OLIVEIRA et al., 2017), colite crônica, vasculite, miocardite, osteomielite e orquiepididimite (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).

Os cães podem ser caracterizados como sintomáticos quando apresentam sinais clássicos da doença, tais como emagrecimento, linfadenopatia, esplenomegalia, alopecia, apatia, ulcerações por todo o corpo, assim como na região das orelhas e bordas nasais, descamação furfurácea da pele e onicogrifose (MARZOCHI et al., 1985; CIARAMELLA et al., 1997; ASSIS et al., 2010; QUEIROZ et al., 2010; FURTADO et al., 2015). Dentro desta categoria os animais são divididos em oligossintomáticos e polissintomáticos. Os oligossintomáticos são aqueles que apresentam sinais leves da doença, tais como adenopatia linfóide, perda de peso moderada e pelos opacos (MANCIANTI

et al., 1988). Os polissintomáticos são os cães com mais de três sintomas de LV, tais como alterações de pele, esplenomegalia, emagrecimento, linfonodos hipertróficos, onicogrifose, alterações oculares e mucosas pálidas (ASSIS et al., 2010).

É possível que alguns cães não apresentem nenhum destes sinais, caracterizando-se como assintomáticos (MANCIANTI et al., 1988; MADEIRA et al., 2004). A maioria da população canina infectada está incluída nesta categoria, o que representa um problema no que diz respeito ao controle da LV pois estes animais têm um alto potencial de se tornarem fontes de infecção aos flebotomíneos (SILVA et al., 2005; DANTAS-TORRES; BRITO; BRANDÃO-FILHO, 2006; LEOTE et al., 2021).

É comum também que alguns animais apresentem LVC associada a outras doenças. Esses quadros podem ocasionar redução na resposta imune e afetar negativamente o diagnóstico, prognóstico e o tratamento, culminando com um cenário de progressão e piora do quadro clínico como um todo (BEASLEY et al., 2021).

Na necropsia de cães com LV é comum identificar lesões de pele, tais como áreas alopecias, úlceras cutâneas (podendo apresentar bordas hemorrágicas) em orelhas e nariz assim como pescoço e cabeça. Segundo Assis et al. (2010), a pele é o órgão/sistema com maior grau de acometimento e que apresenta os sinais clínicos mais importantes em quadros de leishmaniose visceral canina (LIMA et al., 2004). Onicogrifose, hepato e esplenomegalia e nódulos ou áreas esbranquiçadas em pulmões, fígado e baço também são lesões encontradas em cães com LVC (CIARAMELLA et al., 1997; ASSIS et al., 2010; LIMA et al., 2019; PICÓN et al., 2020; MAGALHÃES et al., 2021).

A apresentação clínica e a evolução da leishmaniose nos cães são resultantes de uma série de interações complexas entre a resposta imune do hospedeiro e o parasita, principalmente no que diz respeito aos macrófagos, sendo estas células cruciais para o desfecho da infecção (SANTOS – GOMES et al., 2002), assim como os linfócitos T e suas citocinas.

Dependendo do tipo de infecção parasitária e dos antecedentes genéticos do hospedeiro, é possível que ocorram respostas dos subconjuntos de células T CD4+ e/ou T CD8+ e por sua vez, os efeitos podem ser divergentes sobre o parasita, resultando no controle da infecção ou na ocorrência da doença

(SHER; COFFMAN, 1992). Esta resposta imune mista é encontrada tanto na LV quanto na LVC (CARRILLO; MORENO, 2009).

Mosmann et al. (1986) foram os primeiros a relatar a existência de dois grupos funcionais de células T (Th1 e Th2) e que essa classificação estava associada à produção de interferon gama (IFN – γ) e interleucina 4 (IL-4), respectivamente. Em geral, respostas imunes do tipo Th1 oferecem resistência ao hospedeiro e respostas do tipo Th2 estão associadas à progressão da doença (SHER; COFFMAN, 1992; MORENO et al., 2012; BARBIÉRI, 2006; DAYAKAR et al., 2019).

Os dois tipos de resposta estão presentes no hospedeiro ao mesmo tempo. Uma vez no organismo, os parasitas conseguem modular os mecanismos de morte dos macrófagos, estimulando a produção de IL-4 e fatores estimuladores da doença pelas células T, levando à sobrevivência do parasita. De uma forma simples, o paradigma TH-1/TH-2 vai muito além da dicotomia resolução/progressão da doença, pois diversos elementos regulatórios de uma cadeia muito mais complexa ainda carecem de esclarecimentos (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007).

Com relação a resposta imune, a detecção de anticorpos séricos sugere exposição ao agente e a interpretação desse parâmetro sugere que níveis baixos de anticorpos (transitórios) indicam cães que foram expostos, mas não desenvolveram doença. Já no caso de cães com infecções persistentes, geralmente observa-se um aumento gradativo dos anticorpos ao longo do tempo. Níveis elevados de anticorpos geralmente indicam a condição de doença clínica ou ainda animais persistentemente assintomáticos (BANETH; AROCH, 2008).

É sabido que parasitas do gênero *Leishmania* são capazes de se evadir das respostas imunes do hospedeiro, estabelecendo infecções crônicas por meio da redução das ações microbidas de células da imunidade inata, tais como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, assim como promovem alterações nas vias metabólicas das células imunes inatas que resultam em cascatas de reações imunológicas distintas (VOLPEDO et al., 2021).

Características próprias dos cães podem estar associadas a uma maior ou menor suscetibilidade à LV. Com relação à idade, alguns autores citam que a doença é mais comum em animais mais velhos (IDRISSI et al., 2021), outros, porém, não observam esta ligação (PEREGO et al., 2014). Em relação ao sexo,

Idrissi et al. (2021) e Miranda et al. (2008) correlacionam uma prevalência maior da doença em machos por estes apresentarem comportamento errante e estarem mais disponíveis aos flebotomíneos.

2.3 AGENTE ETIOLÓGICO

A LV tem como agente *Leishmania infantum*, protozoário viscerotrópico pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e Gênero *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1987). Os registros do agente *Leishmania* são antigos, datando de 2.500 aC com descrições primitivas da doença e pesquisas moleculares que identificaram o agente em material arqueológico (AKHOUNDI et al., 2016).

Compreendem organismos unicelulares e com uma estrutura rica em DNA, o cinetoplasto (HERWALDT, 1999). Estes protozoários possuem ciclo heteroxênico, necessitando de dois hospedeiros para completar seu ciclo, sendo um vertebrado, representado principalmente por canídeos silvestres e domésticos, e de um invertebrado, o inseto vetor (SCHLEIN, 1993).

No ciclo urbano, o cão é o principal reservatório doméstico (GONTIJO; MELO, 2004; VIGODER et al., 2010). Além do cão, diversas espécies de mamíferos (rodentia, marsupialia, carnívora etc.) podem se infectar por *Leishmania* spp. (DANTAS-TORRES, 2007), incluindo canídeos silvestres (SOUZA et al., 2010).

As fêmeas de flebotomíneos ao se alimentarem do sangue de um mamífero infectado acabam ingerindo macrófagos contendo as formas amastigotas de *Leishmania* (Figura 1, estágio 5). Após o rompimento dos macrófagos infectados, no trato digestivo anterior, as formas amastigotas se transformam em formas promastigotas (Figura 1, estágio 7), que se diferenciam em promastigotas procíclicas, colonizando o esôfago e a faringe do vetor (Figura 1, estágio 8), transformando-se posteriormente em promastigotas metacíclicas. Após este período, ao procurarem novo hospedeiro para realizar o repasto sanguíneo, as formas promastigotas metacíclicas são liberadas junto à saliva do inseto (Figura 1, estágio 1) (RIBEIRO, 1987; BRASIL, 2014).

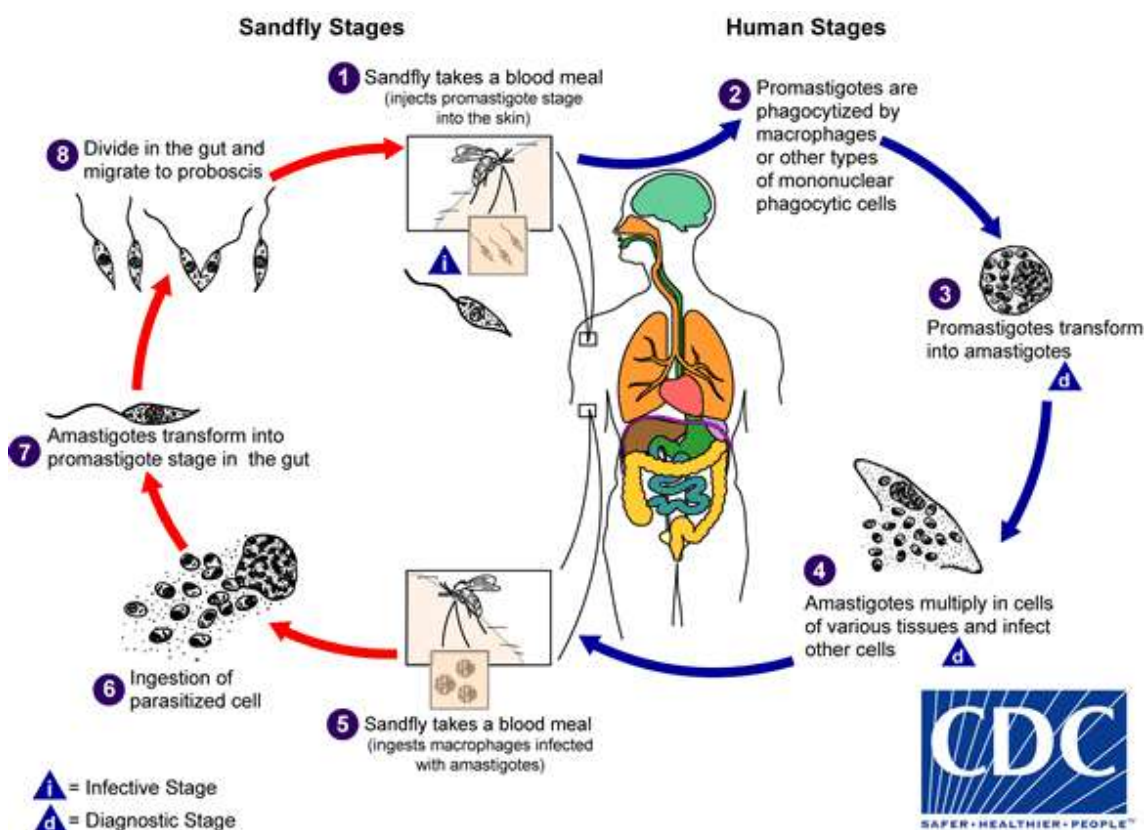
Vale ressaltar que a saliva dos flebotomíneos contribui de maneira significativa para o sucesso da alimentação destes insetos por meio da inibição

dos mecanismos hemostáticos do hospedeiro, além de conter diversas substâncias farmacologicamente ativas que colaboram para os efeitos exacerbados de infectividade por *Leishmania* spp. em hospedeiros mamíferos (KAMHAWI et al., 2000).

Uma substância produzida pelo parasita, conhecida como “gel secretor de promastigota” (PSG) desempenha um papel fundamental na transmissão, uma vez que obstrui o intestino do flebotomíneo, forçando-o a regurgitar formas promastigotas metacíclicas durante a alimentação com sangue (BATES; ROGERS, 2004).

As formas metacíclicas são fagocitadas pelo sistema mononuclear fagocitário presente na pele do hospedeiro definitivo (Figura 1, estágio 2). Uma vez dentro dos macrófagos, diferenciam-se em amastigotas (Figura 1, estágio 3) e multiplicam-se até o rompimento dos mesmos, liberando estas formas que serão novamente fagocitadas, disseminando-se para outros tecidos ricos em células do tecido mononuclear fagocitário, tais como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (Figura 1, estágio 4) (SCHUSTER; SULLIVAN, 2002; BRASIL, 2014).

Figura 2 - Ciclo de *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de CDC (2017).

Esses parasitas são obrigatoriamente intracelulares estando na forma de amastigota em células fagocitárias mononucleares dos hospedeiros vertebrados. O parasita é digenético, isso é, necessita de dois hospedeiros podendo ter duas formas principais: amastigota ou promastigota (LAINSON; SHAW, 1987).

A forma promastigota é conhecida por possuir um corpo alongado, com as duas extremidades afiladas, sendo a anterior mais larga, com um núcleo e um cinetoplasto anterior, do qual parte o axonema e seguindo-se o flagelo. Mede em torno de 20 a 30µm e é encontrado no intestino do hospedeiro invertebrado. O flagelo mede em torno de 30 µm de comprimento, que lhe permite a mobilidade no epitélio intestinal (FORTES, 2004).

A outra forma, amastigota, mede entre 2 e 5µm, possui forma arredondada ou ovalada e flagelo não exteriorizado. Ambas as formas se

multiplicam por fissão binária e possuem uma mitocôndria modificada denominada cinetoplasto (OPS/OMS, 2019).

A taxonomia de *Leishmania* segue o proposto por Levine et al. (1980) e pode ser representada de acordo com a seguinte posição sistemática:

Super-reino Eukaryota; Clado Discoba; Filo Euglenozoa; Classe Kinetoplastea; Subclasse Metakinetoplastina; Ordem Trypanosomatida; Família Trypanosomatidae; Sub-família Leishmaniinae; Gênero *Leishmania*; Subgêneros *Leishmania* e *Viannia*.

Reino: PROTISTA (HAECKEL, 1866)

Sub-Reino: PROTOZOA (GOLDFUSS, 1817)

Filo: SARCOMASTIGOPHORA (HONIGBERG & BALAMUTH, 1963)

Subfilo: MASTIGOPHORA (DIESING, 1866)

Classe: ZOOMASTIGOPHOREA (CALKINS, 1909)

Ordem: KINETOPLASTIDA (HONIGBERG, 1963, emend. VICKERMAN, 1976)

Subordem: TRYPANOSOMATINA (KENT, 1880)

Família: TRYPANOSOMATIDAE (DOFLEIN, 1901 emend. GROBBEN, 1905)

Gênero: *Leishmania* (ROSS, 1903).

O gênero *Leishmania* é caracterizado por uma grande diversidade genotípica (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007), podendo ser dividido em 3 subgêneros: *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)* e *L. (Sauroleishmania)*. Destas, 31 espécies parasitam mamíferos e 20 espécies são patogênicas para o homem (CUPOLILLO; BOITÉ; PORROZZI, 2014).

A divisão do gênero *Leishmania* nos dois subgêneros *Leishmania* e *Viannia* leva em consideração o proposto por Lainson e Shaw (1987), referindo-se ao local de desenvolvimento das formas promastigotas no intestino do vetor. No subgênero *Leishmania*, as espécies desenvolvem-se na porção média e anterior do intestino dos flebotomíneos e no subgênero *Viannia* as espécies apresentam longa permanência no intestino posterior do vetor, na região do piloro. As espécies pertencentes ao subgênero *Sauroleishmania* são conhecidas como “leishmanias de lagartos”, sem importância para o ser humano (BATES, 2007).

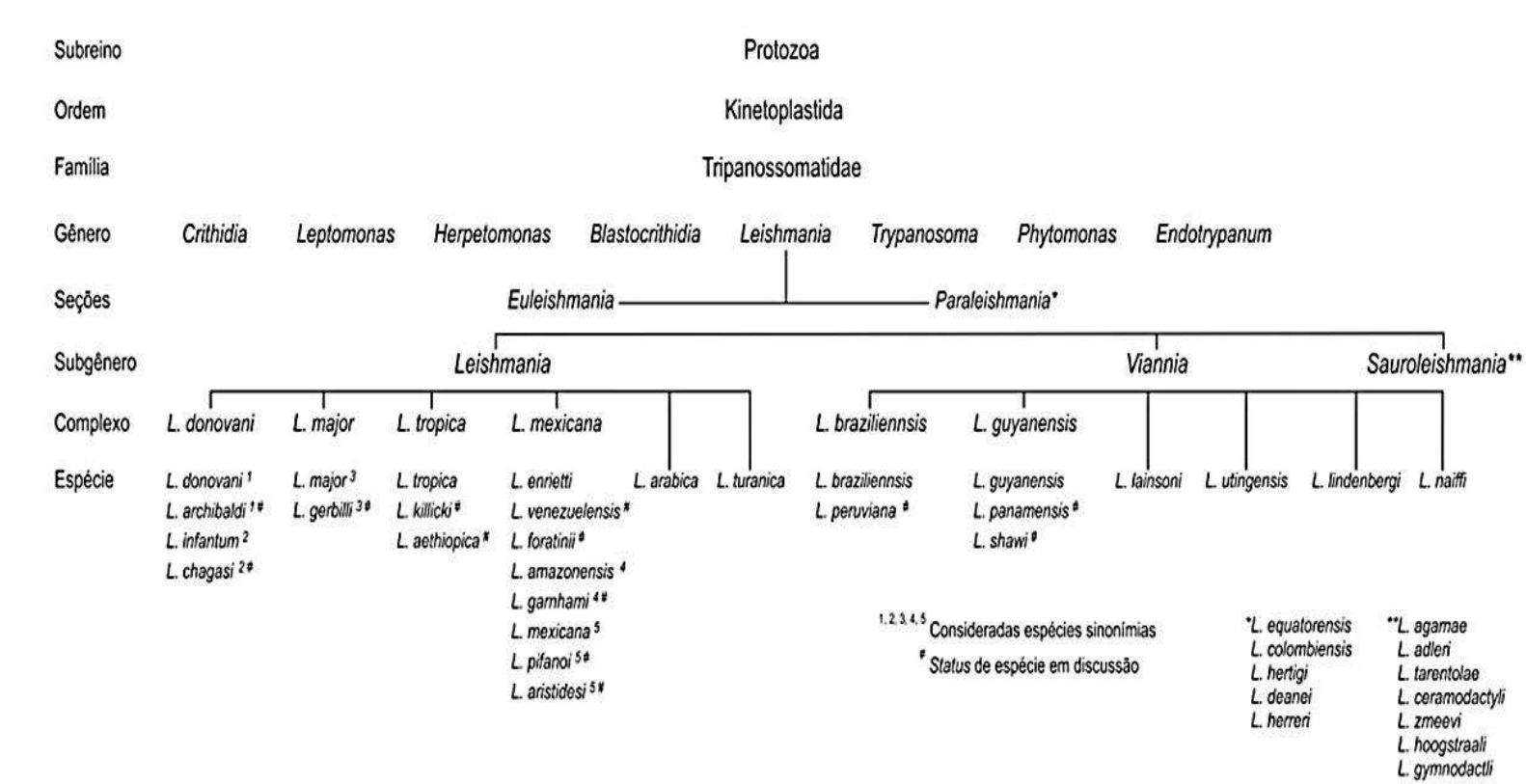
O subgênero *Leishmania* possui distribuição no Velho e Novo Mundo, podendo ocasionar afecções cutânea e visceral. O subgênero *Viannia* é somente encontrado no Novo Mundo e o subgênero *Sauroleishmania* é encontrado no Velho Mundo parasitando répteis/lagartos (BATES, 2007; REAL et al., 2013; CUPOLILLO, BOITÉ; PORROZZI, 2014). Na Figura 2 está representada a divisão taxonômica do gênero *Leishmania*.

Embora não sendo consenso para muitos pesquisadores, estudos sugerem que as diversas formas clínicas de leishmaniose estão associadas às espécies infectantes de *Leishmania* (MURRAY et al., 2005). Neste sentido, a identificação de genes específicos de determinadas espécies ou que estejam sob pressão positiva de seleção pode colaborar para a compreensão dos fatores intrínsecos do parasita que influenciam no curso da doença. Da mesma forma, fatores que são exclusivos ao gênero *Leishmania*, mas que também são compartilhados por outras espécies, podem servir como potenciais alvos terapêuticos ou vacinais. A perda de genes e/ou a formação de pseudogenes correspondem aos principais fatores capazes de moldar o genoma de espécies de *Leishmania* (PEACOCK et al., 2007).

Nos últimos anos inúmeras pesquisas têm sido conduzidas com o intuito de esclarecer a origem de grupos genéticos e diferenças genômicas (LUKES et al., 2007; PEACOCK et al., 2007; ASATO et al., 2009; FRAGA et al., 2010). Rioux e colaboradores (1990) utilizaram análise por isoenzimas para definir os complexos de espécies dentro dos subgêneros, propondo ao final uma nova classificação do gênero *Leishmania* Ross (1903), incluindo *Leishmania chagasi* Cunha e Chagas, 1937, como sinônimo de *Leishmania infantum* Nicole, 1908.

Acreditava-se que *Leishmania chagasi* era uma nova espécie de parasito devido à sua incapacidade de provocar experimentalmente a doença no cão doméstico. Isso a tornou diferente de outro agente já conhecido na bacia do Mediterrâneo, *Leishmania infantum* Nicolle, 1908. Passados 50 anos da descrição de *Leishmania chagasi*, todo o gênero *Leishmania* sofreu uma revisão acurada e finalmente, por meio da utilização de métodos moleculares, foi concluído que ambos os parasitos eram geneticamente idênticos e que *Leishmania chagasi* era sinônimo de *Leishmania infantum* (RIOUX et al., 1990; MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000; DANTAS-TORRES, 2006; SILVEIRA; CORBETT, 2010; KUHLS et al., 2011).

Figura 3 - Classificação taxonômica atual das espécies de *Leishmania* considerando fatores extrínsecos e métodos moleculares e bioquímicos.



Números sobrescritos identificam as espécies em que há discussão quanto à validade taxonômica (possíveis sinónimas).

**Espécie questionada quanto à sua validade taxonômica dentro do gênero.

Fonte: CUPOLILLO, BOITÉ e PORROZZI (2014).

O entendimento em relação ao genoma permite que pesquisas sejam realizadas com o intuito de esclarecer dúvidas sobre a intensidade dos quadros clínicos, variabilidade genética das espécies em diferentes regiões e até mesmo resistência a medicamentos (DOWNING et al., 2011).

Em se tratando da subespécie *Leishmania infantum*, pertencente ao complexo *Leishmania donovani* e causadora da LV, ficou estabelecido que seu genoma possui 36 cromossomos (WINCKER et al., 1996). O entendimento em relação ao genoma permite que pesquisas sejam realizadas com o intuito de esclarecer dúvidas sobre a intensidade dos quadros clínicos, variabilidade genética das espécies em diferentes regiões e até mesmo resistência a medicamentos (DOWNING et al., 2011).

Teixeira et al. (2017) compararam as sequências genômicas de 20 isolados de *L. infantum* do nordeste do Brasil com 29 isolados de *L. infantum/donovani* do Nepal e da Turquia. Evidências de recombinação foram detectadas em 27 dos 36 cromossomos de *L. infantum*.

Em seu estudo, Carvalho et al. (2020) realizaram um levantamento relevante sobre a diversidade genética de 30 isolados de *Leishmania infantum* no Centro-Norte do Brasil, onde identificaram diversas espécies variantes em relação ao isolado ibérico canino (JPCM5) utilizado como referência no trabalho, o que demonstra a proximidade entre isolados de *L. infantum* do Velho e do Novo Mundo.

Por sua vez Segatto et al. (2012) demonstraram que diferentes isolados de *Leishmania infantum* no Brasil são geneticamente homogêneos e apresentam correlação com sua origem geográfica, assim como Marcili et al. (2020) que, estudando isolados de *L. infantum* da região metropolitana de São Paulo, não encontraram diferenças entre as sequências dos diversos isolados nem de outras regiões do Brasil.

Outros achados enfatizam a teoria de que *Leishmania infantum* tenha chegado recentemente às Américas juntamente aos colonizadores europeus, o que vai de encontro aos resultados de baixa diversidade genética encontrados em isolados no Brasil (KUHLS et al., 2011; BATISTA et al., 2012).

Pasquali et al. (2019) avaliaram a dispersão de *Leishmania infantum* utilizando marcadores moleculares no estado do Paraná, obtendo evidências de duas rotas de dispersão, uma vinda do Paraguai e outra do estado de Santa

Catarina. A utilização de marcadores moleculares associados a outras informações, principalmente epidemiológicas, aumentam a confiabilidade nos estudos de dispersão de *Leishmania infantum*.

Desta forma, a taxonomia e o padrão evolutivo dos parasitas *Leishmania* spp são de fundamental importância para a compreensão das diferenças entre as espécies, auxiliando na instituição de ferramentas diagnósticas e em novos métodos de controle (SUNDAR; SINGH, 2018).

2.4 VETOR DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Como vetores no Brasil têm-se insetos flebótomos da espécie *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* no estado do Mato Grosso (MISSAWA et al., 2011). Na Argentina os vetores de *Leishmania infantum* são *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia migonei*; na Colômbia os vetores são *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia evansi*; no Paraguai o vetor é *Lutzomyia longipalpis*, assim como no Uruguai e Bolívia (OPS/OMS, 2019). *Lutzomyia longipalpis* é altamente adaptado às habitações humanas, o que contribui para sua disseminação em áreas rurais e urbanas, sendo relatado em 24 dos 27 estados brasileiros (SOUSA-PAULA; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2020).

No entanto, estudos apontam que diversas outras espécies de flebotomíneos apresentam elevada capacidade de adaptação e sobrevivência em ambientes alterados (MARINHO et al., 2008), inclusive ocorrendo em alta densidade em ambientes artificiais (GOMES; GALATI, 1989), constituindo-se em potenciais transmissores de diversas espécies de *Leishmania* (OLIVEIRA et al., 2010).

Em diversas regiões do país, os flebotomíneos são conhecidos por diferentes nomes populares, tais como mosquito palha, birigui, tatuquira, entre outros. São pequenos, medindo em torno de 1 a 3 mm de comprimento, de coloração clara, depositam seus ovos em matéria orgânica, voam em pequenos saltos e apresentam hábitos crepusculares e noturnos (BRASIL, 2014).

Fatores climáticos, tais como umidade, precipitação e temperatura, podem influenciar no comportamento dos flebotomíneos (RUTLEDGE; ELLENWOOD, 1975; AGUIAR; SOUCASAUX, 1984; BARATA et al., 2004). Porém, Mota et al. (2019) relatam que os fatores bioclimáticos não interferiram na densidade populacional destes insetos. A presença de seres humanos e

animais contribuem para uma maior concentração desses insetos nos ambientes antrópicos (domicílio e peridomicílio) (TEODORO et al., 1993).

No sul do Brasil, no estado do Rio Grande do Sul foi registrado o primeiro relato de *Lutzomyia longipalpis* no município de São Borja no ano de 2008 (SOUZA; SANTOS; FILHO, 2009) e no Paraná no município de Foz do Iguaçu no ano de 2012 (SANTOS; FERREIRA; JUNIOR, 2012).

Em Santa Catarina, área considerada indene para LVC até 2012 (FIGUEIREDO et al., 2012), segundo dados do Setor de Entomologia da DIVE (Diretoria em Vigilância Epidemiológica), no município de Florianópolis as espécies mais encontradas no período de 2014 a 2015 foram *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia neivai* e *Pintomyia fischeri*. A sazonalidade avaliada durante diferentes períodos, compreendidos entre 2010 e 2015, revelou que os meses de dezembro, janeiro e fevereiro apresentaram maior frequência de capturas (DIVE, 2015).

Na região sul de Santa Catarina, nos anos de 2015 e 2016, um estudo realizado nos municípios de Criciúma, Tubarão e Imaruí obteve 4.200 insetos de diferentes ambientes, sendo que destes, sete exemplares eram da subfamília Phlebotominae pertencentes às espécies *Nyssomyia neivai* e *Pintomyia fisheri*. Nenhuma amostra foi positiva para *Leishmania* (VARIZA et al., 2021).

Ainda em SC, na região serrana, Ledo (2021) não detectou a ocorrência de flebotomíneos nas áreas urbana e periurbana do município de Lages. Zuchi et al. (2022) montando armadilhas luminosas do tipo CDC no município de Concórdia, no oeste do estado, no ano de 2021 identificaram *M. migonei*, *P. fischeri*, *P. monticola*, *Psathyromyia serie lanei*, *Brumptomyia carvalhoi* e *Brumptomyia* sp.

A infecção por *Leishmania infantum* em *Lutzomyia neivai* foi confirmada em estudos abordando a possibilidade desta espécie ser transmissora de LV em Florianópolis, teoria esta reforçada pelo fato de ainda não haver registros da presença de *Lutzomyia longipalpis* neste município (DIAS et al., 2013). Da mesma forma, a infecção por *Leishmania infantum* foi identificada em *Lutzomyia neivai* e *Lutzomyia sallesi* no estado de Minas Gerais (SARAIVA et al., 2009) e em *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia forattinii* no município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil (PITA-PEREIRA et al., 2008).

A infecção por *Leishmania infantum* também já foi demonstrada em *Lutzomyia migonei* (GUIMARÃES et al., 2016), *Nyssomyia whitmani* e *Migonemyia migonei* (MOYA et al., 2015) na Argentina (SALOMÓN et al., 2010). No estado de Pernambuco, Brasil, *Lutzomyia migonei* também já teve a infecção por *Leishmania infantum* comprovada (CARVALHO et al., 2010). No estado do Rio de Janeiro, sugere-se que *Lutzomyia migonei* esteja envolvido na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral em áreas com ausência de *Lutzomyia longipalpis* (SOUZA et al., 2003), assim como *Pintomyia fischeri* em Porto Alegre (RÊGO et al., 2019) e na Grande São Paulo (GALVIS-OVALLOS et al., 2017).

Killick-Kendrick (1990) ressaltam, porém, que não basta apenas detectar o DNA de *Leishmania* nas espécies de flebotomíneos estudadas e passar a incriminá-las como espécies transmissoras. Devem ser interpretadas, conjuntamente, características como antropofilia, presença do parasita por tempo suficiente no organismo do vetor, registro do parasita tanto no vetor quanto no hospedeiro simultaneamente, alimentação regular do vetor no reservatório hospedeiro e capacidade de reproduzir a transmissão experimentalmente.

2.5 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Devido ao papel que os cães desempenham no ciclo zoonótico da leishmaniose visceral, é imprescindível que métodos diagnósticos sejam empregados de maneira eficiente nestes animais. Recomenda-se a combinação de diferentes métodos para detectar a infecção, que sejam de fácil empregabilidade à campo, acessíveis aos laboratórios e que utilizem amostras que possam ser coletadas de forma minimamente invasiva (ASSIS et al., 2010; REGINA-SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2014).

Para determinar a presença e a magnitude da doença em uma região, a combinação dos diagnósticos epidemiológico, clínico e laboratorial é imprescindível (DA SILVA et al., 2006; QUEIROZ et al., 2010).

Assim, estudos de cunho epidemiológico são importantes para determinar as variáveis de transmissibilidade da leishmaniose visceral, o que implica nas medidas de controle empregadas posteriormente, principalmente em

se tratando de áreas novas para o registro da doença (JULIÃO et al., 2007; LARA-SILVA et al., 2015).

Em áreas endêmicas, a infecção na população canina é generalizada e a taxa de cães assintomáticos é muito maior do que a fração da população que apresenta sinais da doença, sugerindo que a infecção se espalha de forma rápida entre os cães quando as condições ambientais para a transmissão são ideais (BANETH et al., 2008).

No Brasil, a vigilância epidemiológica é um dos componentes do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), compreendendo o monitoramento entomológico e a vigilância de casos humanos e caninos. É por meio desta análise epidemiológica que os profissionais de saúde poderão identificar e classificar as diferentes áreas de transmissão e a partir delas, instituir as recomendações propostas para a vigilância, monitoramento e controle da doença (BRASIL, 2014).

O diagnóstico clínico da LVC é bastante complexo podendo ser confundindo com outras enfermidades, devido à ausência de sinais clínicos patognomônicos. Os sinais mais comuns são alterações cutâneas, linfadenomegalia local ou generalizada, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, onicogrifose e apatia (MAIA; CAMPINO, 2008).

No estudo de Baneth et al. (2008), as lesões de pele estiveram presentes em 81 a 89% dos casos e eram caracterizadas por dermatite esfoliativa, ulcerativa, nodular e/ou pustular, associadas ao aumento dos linfonodos, que estavam presentes em 62 a 90% dos casos.

Novamente é importante ressaltar que cerca de 60 a 80% dos animais que vivem em áreas endêmicas podem ter contato com o parasita e não desenvolver a doença, apresentando quadro assintomático (ALVAR et al., 1994). Em alguns cães, esta forma da doença pode durar anos, dependendo do estado imunológico do animal e da intensidade da infecção. Estes animais assintomáticos apresentam formas amastigotas de *Leishmania* spp. nos macrófagos da derme, servindo de fonte de infecção para novos insetos vetores (SILVA, 2007).

Devido às características divergentes associadas ao quadro clínico, a leishmaniose pode ser utilizada como exemplo de doença em que infecção não é exatamente proporcional a doença clínica, tornando a LVC um desafio

diagnóstico para médicos veterinários e agentes de saúde pública tanto em áreas endêmicas quanto em locais onde a doença importada se mostra preocupante (BANETH; AROCH, 2008).

Para o diagnóstico laboratorial, algumas técnicas podem ser empregadas, tais como imunohistoquímica em fragmentos de tecidos, exame parasitológico por meio de punções de órgãos (linfonodo e medula), diagnóstico molecular baseado na técnica de PCR (polymerase chain reaction) e exames sorológicos utilizando o ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia (GOMES et al., 2008; FARIA; ANDRADE, 2012).

Muitas das ferramentas de diagnóstico utilizadas atualmente para detectar LVC estão sofrendo alterações para permitir a identificação e quantificação da infecção independente da apresentação de sintomas, assim como os ensaios sorológicos e moleculares estão sofrendo adaptações para se adequarem às condições de campo (ARRUDA et al., 2013; SCHUBACH; FIGUEIREDO; ROMERO, 2014; DUTHIE; LISON; COURTENAY, 2018).

Em cães que apresentem lesões cutâneas papulares/nodulares ou linfadenomegalia, o método de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) deve ser realizado. Esta técnica permite tanto a visualização de formas amastigotas de *Leishmania* no interior de macrófagos quanto amastigotas dispersas no fundo da lâmina devido ao rompimento das células. Não necessariamente o diagnóstico de LVC deve ser descartado se não houver a detecção destas formas, o que indica a utilização de técnicas com maior sensibilidade analítica e diagnóstica, tais como a técnica de PCR (PALTRINIERI et al., 2016).

Na histopatologia dos órgãos, as lesões incluem alterações renais, como glomerulonefrites ocasionadas por deposição de imunocomplexos (WILSON et al., 2017) e alterações hepáticas caracterizadas por inflamação granulomatosa e fibrose (TOPLU; AYDOGAN, 2011; MARQUES et al., 2018; LIMA et al., 2019).

A pele pode apresentar reações inflamatórias crônicas (granulomas), independentemente do local em que foi coletada, mas variando de acordo com o estado clínico do animal, tendo correlação positiva entre o nível de parasitismo e a capacidade de infecção para os flebotomíneos em cães (MANNA et al., 2004; XAVIER et al., 2006; VERÇOSA et al., 2008). Travi et al. (2001) no entanto observaram que a correlação entre a presença do parasita na derme e a

potencial transmissão ao vetor é baixa ou inexistente, citando ainda que o parasitismo da pele ocorre como um evento tardio durante o curso da doença.

Tafuri et al. (2001) relatam que um cão sintomático com diversas lesões clássicas e com confirmação de formas amastigotas de *Leishmania* em diversos órgãos não apresentou formas parasitárias na pele. Furtado et al. (2015) também relatam baixas taxas de detecção de *L. infantum* em amostras de pele utilizadas em seu estudo, o que, segundo estes autores, pode estar associada à menor frequência de infecção ativa nesse tecido.

No baço as lesões incluem hiperplasia nodular associada a processos inflamatórios crônicos (granulomas) (TRYPHONAS et al., 1977; FREITAS; LIMA; NUNES-PINHEIRO, 2017) e periesplenite com ruptura da arquitetura e comprometimento do órgão (CIARAMELLA et al., 1997; SANTANA et al., 2008; LIMA et al., 2014). Lesões em diferentes segmentos intestinais também são relatadas (PINTO et al., 2015; DA SILVA et al., 2020), assim como alterações na microarquitetura do timo. No fígado, observam-se granulomas intralobulares associados à inflamação crônica (ASSIS et al., 2010; MADEIRA et al., 2016). Nos linfonodos é possível observar linfadenite granulomatosa com infiltrados de macrófagos, linfócitos e neutrófilos (LIMA et al., 2004; COSTA et al., 2008).

A imunohistoquímica é uma técnica de diagnóstico direto que se baseia na detecção dos parasitas em formas amastigotas em cortes de tecidos corados, como linfonodos, fígado, baço, rins, pele, medula óssea, intestino, pulmões e glândulas adrenais (TOPLU; AYDOGAN, 2011; MENEZES et al., 2016; MAGALHÃES et al., 2021). Diversos autores apontam uma maior sensibilidade em relação à técnica histopatológica, principalmente quando aplicada em tecidos que não possuem uma alta carga parasitária (KENNER et al., 1999; XAVIER et al., 2006; MOREIRA et al., 2007; TAFURI et al., 2004; TASCA et al., 2009). Ordeix et al. (2005) e Xavier et al. (2006) indicam uma menor sensibilidade em relação à técnica de PCR.

O método de cultivo constitui-se em uma ferramenta diagnóstica importante e ao mesmo tempo desafiadora, pois contribui para o estudo dos parasitas a partir da compreensão da fisiologia, do comportamento, crescimento, metabolismo, assim como os diversos e complexos estágios de desenvolvimento. Não é um método simples de executar, pois exige

conhecimento acerca das condições que cada parasita necessita para poder crescer (AHMED, 2014).

Para a execução deste método, são necessários meios que devem fornecer condições semelhantes ao que ocorre no inseto vetor, ou seja, as amastigotas viáveis devem se diferenciar em promastigotas e se reproduzir. Os principais meios utilizados incluem o meio bifásico, o meio Novy e MacNeal modificado por Nicolle (NNN) e o meio *Drosophila* de Schneider enriquecido com soro fetal bovino (REIMÃO et al., 2020).

O primeiro registro de tentativa de cultivo de *Leishmania* spp. foi com o meio Novy, McNeal e Nicole (NNN) no ano de 1904 (NOVY; McNEAL, 1904) e posteriormente modificado por Nicole em 1908 (NICOLE, 1908).

Os métodos moleculares são reconhecidos por serem confiáveis na detecção de DNA de *Leishmania* em amostras clínicas (IKONOMOPOULOS et al., 2003). Em comparação com outras técnicas, a técnica de PCR pode demonstrar superioridade em diagnosticar leishmaniose visceral canina em amostras provenientes de diversos tecidos do organismo (XAVIER et al., 2006).

Dentre as técnicas moleculares de diagnóstico, destacam-se a PCR convencional (SINGH, DEY; SIVAKUMAR, 2005), Nested-PCR (PCR aninhado), PCR Multiplex, PCR em tempo real ou qPCR, NASBA (amplificação baseada em sequência de ácido nucleico), OC-PCR (PCR por oligo-cromatografia), RAPD-PCR (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente), AFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado), LAMP (Amplificação isotérmica mediada por loop) e MLEE (Eletroforese de enzima multilocus), dentre outros (THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020). Esta diversidade de técnicas dificulta uma padronização para o uso no Serviço de Saúde Pública.

O uso da PCR convencional sugere apenas dois valores possíveis, ou seja, se o cão é positivo ou negativo para parasitas de *Leishmania*, sem quantificar a carga parasitária (SUNDAR; SINGH, 2018). Com o emprego da técnica de qPCR é possível avaliar a eficácia do tratamento e a progressão da doença, principalmente em áreas endêmicas onde grande parte dos cães está exposta, mas somente uma pequena porcentagem desenvolve a doença clínica (FRANCINO et al., 2006).

Não existe um consenso entre os pesquisadores sobre qual a melhor amostra a ser coletada. Manna et al. (2004), Solano-Gallego et al. (2011) e Reis

et al. (2013) citam como melhores as amostras de pele, enquanto Paparcone et al. (2013) e Travi et al. (2018) as de medula óssea e linfonodos e Solcà et al. (2014) citam o sangue e o baço.

Queiroz et al. (2010) enfatizam que a técnica de PCR é extremamente eficaz no diagnóstico de LVC e ressaltam que a mesma poderia ser empregada como técnica de eleição. Porém, a PCR se mostra de difícil aplicabilidade prática, não condiz com a realidade da rotina de muitos laboratórios e ainda não é uma técnica padronizada pelo Ministério da Saúde no Brasil.

Dentre as técnicas laboratoriais os testes sorológicos são rotineiramente utilizados para o diagnóstico da LVC devido a sua facilidade de aplicação em amostras de soro ou plasma. Apesar da técnica de PCR ser mais sensível, sua implementação depende de uma infraestrutura mínima, muitas vezes limitada à laboratórios de referência e de pesquisa, o que torna a sorologia um elemento chave no auxílio do diagnóstico (LÉVÊQUE et al., 2020).

Dentre os testes sorológicos destacam-se os testes de imunofluorescência de anticorpos, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), de imunocromatografia, de aglutinação direta, western blot e de aglutinação em látex (ASFARAM et al., 2018).

O ELISA é um método simples e sensível, utiliza placas com poços revestidos com antígenos de interesse onde serão ligados os anticorpos da amostra testada (ENGVALL; PERLMANN, 1972). No Brasil o método ELISA é utilizado como teste confirmatório no protocolo de diagnóstico da LVC (BRASIL, 2011).

A sensibilidade e a especificidade em diferentes modalidades de testes podem variar de acordo com o tipo de antígeno utilizado (LÉVÊQUE et al., 2020), ou ainda com o curso da doença, sendo mais baixa no início da infecção aumentando gradativamente (QUINNELL et al., 2001). No estudo de Porrozzi et al. (2007), a utilização de antígenos recombinantes aumentou a especificidade se comparado ao uso de antígenos brutos, que forneceram 87% de especificidade, enquanto antígenos quiméricos recombinantes atingiram 79 a 96% de sensibilidade para LVC e especificidade que variaram de 96 a 100%, dependendo do painel de controle negativo utilizado. O uso conjunto dos três antígenos recombinantes do estudo alcançou uma sensibilidade geral de 100%,

o que demonstra a possibilidade de um teste diagnóstico com melhor desempenho.

Embora apresente resultados satisfatórios, estudos têm demonstrado divergências em inquéritos sorológicos colocando em dúvida a acurácia da sorologia em detectar animais positivos sintomáticos e assintomáticos (ROCHA et al., 2020) ou ainda provocando reações cruzadas em testes de leishmaniose provenientes de cães com infecções ocasionadas por outros agentes patológicos (COUTO et al., 2010; MIRÓ et al., 2013; ZANETTE et al., 2013; RIBOLDI et al., 2018). Krawczak et al. (2015), no entanto, reiteram que talvez não seja exatamente uma reatividade cruzada entre *Leishmania infantum* e outros patógenos (como por exemplo *Ehrlichia canis* e *Babesia canis vogeli*) mas sim, uma coinfeção casual.

Em 2011, por meio de Nota Técnica, o Ministério da Saúde substituiu o protocolo de diagnóstico da LVC, excluindo o uso da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) como teste confirmatório. Atualmente utiliza-se o Teste Imunocromatográfico DPP® (Dual Path Plataform, Bio-Manguinhos) (ANEXO I) como teste de triagem e o ELISA (Kit EIE Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos) para confirmação dos casos (BRASIL, 2011) (ANEXO II). O Ministério da Saúde recomenda que somente as amostras que foram positivas no DPP® sejam confirmadas pelo método ELISA (*Leishmania major* - like-Elisa - EIE Leishmaniose Visceral Canina, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) (FUJIMORI et al., 2021). A utilização de testes combinados em série, como utilizado pelo Ministério, melhoram a acurácia diagnóstica (ARRUDA et al., 2016).

A utilização de um ELISA com antígeno recombinante, utilizando proteínas mais específicas produzidas em escala industrial, pode detectar infecções mais precoces do que o protocolo ELISA atualmente utilizado pelo Ministério da Saúde (SCALONE et al., 2002; PORROZZI et al., 2007; SANTARÉM et al., 2010; VENTURIN et al., 2015; RAMÍREZ et al., 2020; FUJIMORI et al., 2021).

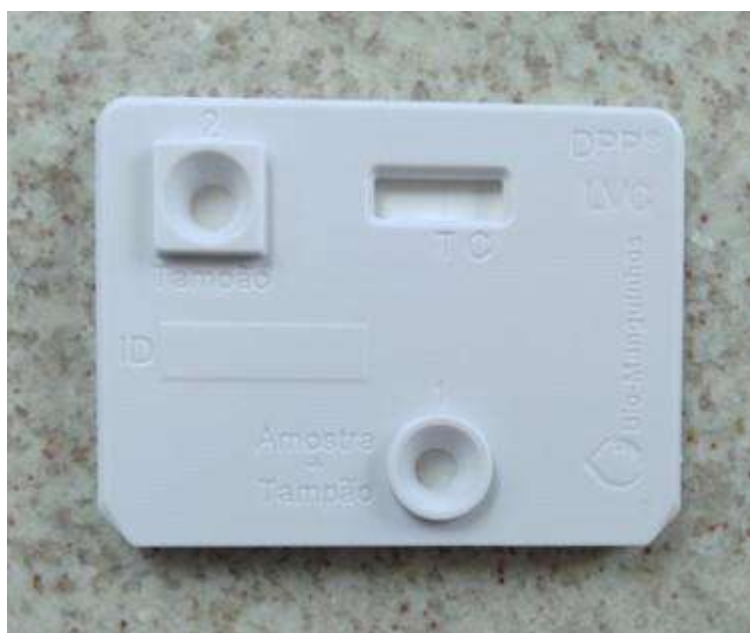
O teste sorológico pela técnica de imunocromatografia é uma ferramenta largamente utilizada pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde. O DPP® foi desenvolvido com o intuito de facilitar o diagnóstico da LVC a campo, contribuindo para melhorar o diagnóstico e tendo

efeitos positivos no controle da doença (SCHUBACH; FIGUEIREDO; ROMERO, 2014; FRAGA et al., 2016; LARSON et al., 2017; FIGUEIREDO et al., 2018).

Validado no Brasil, o teste DPP® (TR-DPP®-Bio-Manguinhos) apresenta sensibilidade e especificidade de 83% e 73%, respectivamente. Utiliza uma combinação de proteína A conjugada com partículas de ouro coloidal e antígenos recombinantes K28 de *Leishmania*, que detecta anticorpos específicos, podendo ser realizado utilizando-se soro, plasma ou sangue total, o que facilita sua execução à campo contribuindo para melhorar o diagnóstico e tendo efeitos positivos no controle da doença (SCHUBACH; FIGUEIREDO; ROMERO, 2014).

O kit DPP® (Figura 3) é produzido pela Fiocruz (Unidade Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil), é descartável e pronto para o uso. Consiste em um cassete de plástico, contendo duas membranas de nitrocelulose que estão conectadas em formato de “T”, permitindo a deposição da amostra de teste e o reagente para a detecção de anticorpos. O teste requer uma amostra de apenas 5µL de soro, plasma ou sangue total e de duas gotas da substância tampão, que já está incluída no kit. Existem duas bandas para interpretação, uma de teste e outra de controle. Na ausência de anticorpos específicos, nenhuma banda é visível. Em casos considerados negativos, há o aparecimento de uma linha vermelha e em casos positivos, o surgimento de duas linhas vermelhas. O tempo necessário para se proceder à leitura é de 15 minutos (GRIMALDI et al., 2012).

Figura 4 - Dispositivo de teste DPP® (Dual Path Platform) Bio-Manguinhos



Fonte: Própria do autor (2022).

Anteriormente, este teste utilizava agentes recombinantes específicos K26/K39 (GRIMALDI et al., 2012). Porém, a rK28, uma proteína quimérica recombinante com múltiplos epítomos (FRAGA et al., 2016), resultou da fusão entre sequências específicas de antígenos K9, K26 e K39, sugerindo seu uso no sorodiagnóstico de leishmaniose visceral canina e humana por apresentar níveis muito altos de sensibilidade e especificidade (BOARINO et al., 2005), sendo essa possibilidade confirmada no estudo de Pattabhi et al. (2010).

Coura-Vital et al. (2014) relataram que o atual protocolo utilizando DPP® e ELISA detectou maior prevalência e incidência de cães infectados do que o protocolo que anteriormente utilizava ELISA e RIFI. Outro ponto positivo sobre a utilização do DPP® como teste de triagem a campo seria a diminuição da demanda por exames (ELISA) nos LACENs (Laboratórios Centrais de Saúde Pública), uma vez que somente cães positivos no DPP® terão amostras encaminhadas para o teste ELISA, diminuindo a realização de exames de bancada pelos laboratórios. Estes autores sugeriram a utilização do DPP como teste confirmatório e o ELISA como teste de triagem, isso devido a capacidade do DPP® em garantir resultados verdadeiramente positivos, por ter menor custo e apresentar resultados mais rápidos, o que também é enfatizado por Laurenti et al. (2014). Mendonça et al. (2017) relataram uma menor proporção de falso-

negativos com a utilização de TR DPP® ou seja, poucos cães infectados permaneceriam nas áreas de risco, confirmando sua escolha como teste de triagem padrão em relação ao ELISA/RIFI.

Conforme visto, o ideal é que os protocolos para diagnóstico de LVC devem ser avaliados conjuntamente, com uma abordagem mais ampla associando-se a epidemiologia com técnicas clínicas e laboratoriais.

2.6 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

No Brasil os padrões epidemiológicos de transmissão da LV têm sofrido mudanças nas últimas décadas. Inicialmente, apresentava-se em áreas rurais e periurbanas, mas devido a alguns fatores, tais como a urbanização e a destruição de ecótopos silvestres, oferta de fontes alimentares humanas e a presença de animais domésticos, arborização abundante, más condições sanitárias com o acúmulo de lixo e a presença de abrigos de animais silvestres dentro do perímetro urbano, possibilitaram a domiciliação do vetor *Lutzomyia longipalpis*, levando a expansão para as áreas urbanas de cidades de médio e grande porte (MESTRE; FONTES, 2007; BRASIL, 2014).

A dispersão para regiões consideradas indenes segue padrões de distribuição espacial e de concentração semelhantes aos fluxos migratórios da população, associados pelo desenvolvimento social, industrial e turístico (REBÊLO et al., 2010), seguindo os corredores de circulação. A introdução de cães infectados em determinadas áreas pode estar associada à migração, uma vez que estes animais, muitas vezes, são trazidos infectados da região de origem, contribuindo para a infecção dos flebotomíneos presentes em áreas de desmatamento recente e em zonas periurbanas (MESTRE; FONTES, 2007; THOMAZ-SOCCOL et al., 2009).

O estado de São Paulo é um bom exemplo da rápida disseminação da leishmaniose visceral humana e canina. A construção da rodovia Marechal Rondon e do gasoduto Bolívia-Brasil são fatores que coincidiram com o aumento no número de casos da doença nos últimos anos, muito por conta do fluxo de humanos, cães e vetores infectados (CARRANZA-TAMAYO et al., 2010; CARDIM et al., 2013; CASANOVA et al., 2015; SEVÁ et al., 2017).

Em um estudo na região do extremo oeste do Paraná foram identificadas três possíveis rotas de disseminação da LVC no centro-sul do Brasil. A primeira delas seria a dispersão da Bolívia para os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo por meio da implantação do gasoduto Bolívia-Brasil no período de 1998 a 2005. Em segundo, a dispersão do Paraguai para o Brasil na região da tríplice fronteira (Foz do Iguaçu e Santa Terezinha de Itaipu) durante o período de 2012 e em terceiro, o surgimento de um novo cluster de *Leishmania infantum* no oeste do estado de Santa Catarina e sua dispersão para o sul do estado do Paraná, especificamente no município de Pato Branco após 2013 (PASQUALI et al., 2019). Acredita-se que a introdução da LVC no estado do Rio Grande do Sul tenha ocorrido no município de Uruguaiana na fronteira com o município de Paso de Los Libres na Argentina no ano de 2009 (MONTEIRO et al., 2010).

No estado do Paraná a doença tem sido identificada normalmente de forma alóctone (THOMAZ-SOCCOL et al., 2009), mas o que tem chamado a atenção são os casos ocorridos na região de Foz do Iguaçu (THOMAZ-SOCCOL et al., 2017; THOMAZ-SOCCOL et al., 2018; DIAS et al., 2020). No mesmo município teve-se o primeiro registro de *Lutzomyia longipalpis* no estado, ocorrido no ano de 2012, onde foram capturados 40 exemplares, reforçando a distribuição geográfica do vetor e da doença neste estado (SANTOS; FERREIRA; JUNIOR, 2012).

No Rio Grande do Sul, o primeiro diagnóstico de LVC em Santa Maria ocorreu em 1985. Anos depois, em 1998, Pocai et al. (1998) relataram a doença em cinco cães por meio de exame post-mortem, no mesmo município. Em São Borja no ano de 2008 foi descrita pela primeira vez no estado do Rio Grande do Sul a ocorrência de exemplares de *Lutzomyia longipalpis* (SOUZA; SANTOS; FILHO, 2009). Em Porto Alegre houve o relato de um caso canino caracterizado como autóctone em 2016 (BIANCHI et al., 2016), além de que na região metropolitana, especificamente nos municípios de Canoas, Novo Hamburgo e São Leopoldo, identificou-se uma prevalência de 4% de LVC nesta que é considerada área indene (RIBOLDI et al., 2018). O município de Uruguaiana é considerado área endêmica para transmissão de LVC com presença de cães positivos em todos os bairros (ESCOBAR et al., 2018; ESCOBAR et al., 2019).

No estado de Santa Catarina o relato dos primeiros casos autóctones de LVC ocorreu no ano de 2012 em Florianópolis (FIGUEIREDO et al., 2012), assim como o primeiro surto autóctone, no ano de 2013, no mesmo município (STEINDEL et al., 2013). Nesse sentido, Pacheco et al. (2013) realizaram um estudo sorológico em 491 cães utilizando os testes ELISA e RIFI. Os resultados apontaram uma possível dispersão urbana de *Leishmania* spp. em Florianópolis. Apesar de não haver a confirmação da espécie de *Leishmania* envolvida, os autores enfatizam a necessidade de uma investigação epidemiológica minuciosa com o intuito de prevenir o avanço urbano da doença.

Em 2014, um estudo piloto foi realizado nos municípios de São Miguel do Oeste e Descanso, região do extremo oeste catarinense, com o intuito de prever a soroprevalência de LVC. Os resultados demonstraram que dos 252 cães pesquisados, 41 foram positivos pelo ensaio ELISA, 43 pelo método de RIFI (título > 40) e 55 por PCR. Os dados obtidos confirmaram a presença da doença nestes municípios e demonstraram a possível ocorrência de um surto da doença em cães com o envolvimento de humanos em casos futuros (MAZIERO et al., 2014).

Pinto et al. (2022) identificaram os primeiros casos positivos de LVC na região do meio-oeste de Santa Catarina, onde de 126 cães avaliados, 16,7% foram positivos no teste ELISA, 11,9% na RIFI e 7,1% apresentaram amplificação específica para *Leishmania infantum* na técnica de PCR.

Conforme Ledo (2021), em Lages, região serrana de SC, do ano de 2018 a 2020 foram registrados seis casos de cães sororreagentes, todos importados do Tocantins, Paraíba e/ou Distrito Federal (CCZ/Lages).

Diante deste cenário preocupante, diversos fatores podem estar associados a expansão geográfica da LVC no Brasil, tais como a dificuldade na eliminação dos reservatórios, entraves financeiros e sociais para a instituição de medidas de controle, diversidades epidemiológicas das áreas afetadas e a insuficiência nas estratégias de controle dos vetores já reconhecidos e daqueles ainda suspeitos (SILVA; MADEIRA; FIGUEIREDO, 2015).

2.7 CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Nas Américas, as medidas estratégicas para o controle da LVC são de extrema importância no intuito de se reduzir os casos em humanos. Estas

medidas incluem a notificação de casos e a vigilância ativa por meio de inquéritos sorológicos de reservatórios, análise de risco e eutanásia dos animais infectados (OPAS, 2009).

No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio do Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral visa o controle da enfermidade em humanos. Para tanto, preconiza ações de vigilância epidemiológica envolvendo o monitoramento entomológico (flebotomos), vigilância dos casos caninos e humanos, além de medidas preventivas e de controle, incluindo o diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, pulverização com inseticidas de efeito residual, ações de educação em saúde, além da eutanásia de animais sororreagentes (BRASIL, 2014).

O tratamento humano para LV dispõe de um aparato terapêutico limitado pois algumas drogas apresentam resistência e toxicidade elevada, sendo os antimoniatos pentavalentes os principais medicamentos utilizados para a terapia de LV no mundo (GUERIN et al., 2002). Apesar de liberado em condições específicas, o tratamento em cães não é considerado medida de controle (BRASIL, 2014). A Portaria Interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008, que regulamenta o tratamento de cães, também proíbe o tratamento da LVC com produtos de uso em humanos ou não registrados no MAPA (BRASIL, 2008).

Neste sentido, o Ministério da Saúde, por meio de Nota Informativa nº 34 de 2016, emitiu parecer sobre a Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), autorizando o registro do produto Milteforan®, da empresa Virbac Saúde Animal, para o tratamento de cães com LVC. O documento esclarece que o tratamento de cães com LVC não se caracteriza como medida de saúde pública para o controle da doença, sendo esta uma escolha individual de cada proprietário. Porém, o tratamento não exime o tutor da responsabilidade de acompanhamento médico veterinário periódico de seu animal, além do uso concomitante de outras estratégias de controle (BRASIL, 2016).

É comprovado que o tratamento apenas reduz os sinais clínicos e não promove cura parasitológica, o que torna estes animais uma fonte de infecção permanente (OPS/OMS, 2019).

Outro fator desfavorável ao tratamento é que a maioria das drogas utilizadas para tratar LV ou LVC possuem custos inacessíveis para a maioria da

população (SUNYOTO; POTET; BOELAERT, 2018), como é o caso da miltefosina, que além do custo não tem eficácia comprovada (ANDRADE et al., 2011). Nesse sentido, há um comprometimento na instituição desta alternativa de controle (LOISEAU; POMEL; CROFT, 2020), o que estimula o uso de diversas combinações de fármacos sem, necessariamente, terem resultados efetivos (MANNA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2018). Isso se reflete em diferentes práticas de tratamento que correspondem às condições socioeconômicas e culturais de cada região (MARTY; ROSENTHAL, 2002).

Há evidências de que a terapia em cães com fármacos de utilização humana acabe por aumentar o risco de geração de cepas resistentes a estes fármacos, recomendando-se a proibição do uso em cães de drogas de registro para uso humano (OPAS, 2009). Nesse sentido, duas inferências se fazem necessárias do ponto de vista epidemiológico em relação ao tratamento: primeiro, que pode levar a resistência aos medicamentos utilizados e segundo, que favorece a recorrência da transmissão pois não há cura (SLAPPENDEL; TESKE, 1997; RIERA et al., 1999; MORENO; ALVAR, 2002).

Aos proprietários de cães que realizam o tratamento, recomenda-se reduzir ao máximo o contato dos animais com os vetores (principalmente nos horários do amanhecer e anoitecer), utilização de repelentes tais como coleiras impregnadas com deltametrina a 4% e a utilização de vacinas, apesar de sua efetividade não ser comprovada no controle da doença nos animais e muito menos na redução da incidência da doença em humanos (OPS/OMS, 2019).

Outra forma de controle da LVC seria a utilização de vacinas. Esta prática iniciou no século XX. No primeiro processo, apenas para humanos, os agentes causadores da leishmaniose eram colocados diretamente sobre a pele de um indivíduo saudável a fim de que se criasse resistência à doença, procedimento conhecido como *leishmanização*, protegendo-o no futuro. Já na segunda geração tem-se utilizado alvos específicos, como proteínas recombinantes e poliproteínas, demonstrando resultados promissores (EVANS; KEDZIERSKI, 2012; SINGH; SUNDAR, 2012).

A técnica de edição de genoma CRISPR é uma dessas técnicas e demonstra ser possível desenvolver cepas atenuadas mais seguras de *Leishmania*, capazes de induzir imunidade protetora em uma etapa de

leishmanização de segunda geração específica para humanos (PACHECO-FERNANDEZ et al., 2021).

Apesar dos avanços científicos e tecnológicos, as vacinas contra a leishmaniose ainda precisam ser melhoradas até que se crie uma vacina universal e efetiva. Porém, um dos maiores problemas se encontra na alta variedade genética do parasita, além da grande dificuldade de se encontrar marcadores de resistência nos pacientes curados e a falta de sistemas práticos de desafio infeccioso simulando a infecção natural para uma melhor avaliação da vacina (GRADONI, 2015).

Somam-se ainda outros fatores limitantes tais como o custo de desenvolvimento, o conhecimento insuficiente das respostas imunológicas necessárias à proteção e o baixo investimento em pesquisas por parte dos governos em nações severamente afetadas (EVANS; KEDZIERSKI, 2012).

Outra forma de controle diz respeito ao uso de inseticidas para controlar as formas adultas do vetor, uma vez que os locais de criadouros são desconhecidos (GONTIJO; MELO, 2004). Este método de controle é considerado eficaz, uma vez que, aplicado no interior de residências e abrigos de animais, reduz o número de flebotomíneos e por consequência, as taxas de transmissão da LV (GUERIN et al., 2002).

Pelo fato de a LV se tratar de uma doença que pode se apresentar de formas diferentes de um cão para outro, onde a cura parasitológica não ocorre e as recidivas clínicas são frequentes, presume-se que a vacinação dos animais suscetíveis (embora discutível) associada ao uso de inseticidas tópicos corresponde à forma mais eficaz de prevenção e controle da doença (MIRÓ et al., 2008; RIBEIRO et al., 2018), quando ainda não a eutanásia.

Em relação à prevenção, no que diz respeito às políticas públicas, o uso de coleiras impregnadas com inseticida demonstra ser o melhor método, pois afeta diretamente a força de infecção e o contato vetor-cão, além de ter fácil aceitação e aplicação por parte da população (SEVÁ et al., 2016).

2.8 GEORREFERENCIAMENTO

Os Sistemas de Informações Geográficas (SIGs) têm fundamental importância na área da saúde, pois é por meio destas técnicas e suas derivações que é possível identificar padrões espaciais de acordo com a ocorrência de

doenças e organizar, a partir disso, medidas em saúde pública (MATSUMOTO; GUIMARÃES, 2014).

Características ambientais tais como o tipo de cobertura vegetal e do solo, grau de urbanização, temperatura na superfície terrestre e estilo de moradia são variáveis que podem ser utilizadas nestes estudos (ALMEIDA; WERNECK; RESENDES, 2014; ABRANTES et al., 2018).

O emprego de bases cartográficas, tais como do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) permite a construção de mapas em camadas com informações diversas que podem incluir ambiente, vetor e reservatório. Desta forma, é possível estabelecer padrões de distribuição dos indicadores, permitindo a correlação entre os setores estudados, como por exemplo, áreas com ocorrência de infecção humana, áreas com prevalência de infecção canina e regiões com potencial de risco para ocorrência da doença (CAMARGO-NEVES et al., 2001).

Além de mapas de bases pré-estabelecidas, é possível utilizar bancos de imagens de satélites e por meio de aplicativos fazer a segmentação e classificação por algoritmos, criando objetos em diferentes escalas, de acordo com padrões de forma, cor e homogeneidade, correlacionando-os entre si (FIGUEIREDO et al., 2017).

Com a criação de mapas temáticos, em conjunto com espacialização de amostras de dados coletados a campo, outras ferramentas de análise e estatística também podem ser empregadas para avaliar as rotas de disseminação da doença. Um exemplo seria a análise espacial Kernel e razão Kernel, que permite obter a distribuição de casos, incidência e mortalidade, assim como métodos que permitem avaliar a dispersão espaço-temporal (CARDIM et al., 2016).

Não menos importante são os modelos de previsão, que por meio da análise de diferentes probabilidades permitem direcionar para áreas específicas medidas de controle mais eficientes (ALMEIDA; WERNECK, 2014).

Diversos estudos em diferentes regiões do Brasil empregaram modelos de análise espaço-temporal para determinar rotas de dispersão, padrões de evolução para casos humanos e animais e ferramentas que permitiram avaliar as expansões geográficas no processo de urbanização da LV (BEVILACQUA et al., 2001; LUZ et al., 2001; CARDIM et al., 2013; MATSUMOTO; CASAGRANDE;

GUIMARÃES, 2013; MATSUMOTO; GUIMARÃES, 2014; SILVA; MADEIRA; FIGUEIREDO, 2015; CARDIM et al., 2016; SEVÁ et al., 2017; SILVA et al., 2017). Vale ressaltar que os aspectos diagnósticos devem ser considerados quando da comparação de mapas temáticos de séries temporais, levando-se em consideração a variação nos critérios diagnósticos da infecção canina ao longo do tempo (TEIXEIRA; SILVA; ROMERO, 2021).

De acordo com Correia et al. (2007) a aplicação de técnicas de geoprocessamento pode contribuir para o entendimento do processo de urbanização da leishmaniose visceral, processo este que muitas vezes está associado às condições precárias de moradia e às alterações ambientais. Estas ferramentas podem auxiliar na criação de estudos prospectivos para fatores de risco em endemias urbanas e consequentemente na instituição de medidas preventivas em saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência sorológica de LVC em cães no estado de Santa Catarina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a prevalência da LVC, por meio de inquérito sorológico, utilizando as técnicas do teste imunocromatográfico rápido em plataforma de duplo percurso (Dual Path Platform – DPP®) e Ensaio Imunoenzimático (EIE).
- Estabelecer os índices de ocorrência por região no Estado de Santa Catarina.
- Confirmar o diagnóstico sorológico de cães positivos por meio de técnicas moleculares (PCR), parasitológicas (imuno-histoquímica) e histopatológica para confirmação e descrição das lesões.
- Georreferenciar os casos e não casos com a elaboração de mapas para a espacialização da doença
- Utilizar a técnica do índice de Kernel para avaliação da intensidade da doença

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa teve aprovação pelo Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do CAV/UDESC, sob protocolo número 3537040719 (ID 001022), em 13/09/2019.

4.1 AMOSTRAS

As amostras de sangue canino foram coletadas por conveniência e de maneira aleatória em todas as seis mesorregiões do Estado de Santa Catarina (Figura 4), localizado no Sul do Brasil, no período de maio 2019 a maio 2021, de animais provenientes de UVZs (Unidade de Vigilância de Zoonoses), de abrigos ou domiciliados, desde que tivessem um tutor responsável para assinar o termo de consentimento. Devido a facilidade de coleta e o apoio dos setores de Vigilância Epidemiológica dos municípios, as amostras foram predominantemente de animais de abrigo ou de rua.

Figura 5 - Mesorregiões do Estado de Santa Catarina.



Fonte: Própria do autor (2022).

A coleta foi realizada por venopunção cefálica ou jugular, com agulhas descartáveis 21G. 4 mL de sangue foram acondicionados em tubos sem anticoagulante com ativador de coágulo para obtenção de soro. As amostras foram armazenadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável a 10 °C até a separação do soro por centrifugação a 2000 g por 10 minutos, sendo armazenados à - 20 °C para posterior submissão aos testes diagnósticos. Os testes de triagem (DPP®) eram realizados no mesmo dia, poucas horas após as coletas.

O principal critério de inclusão se baseou nos cães que eram domiciliados em Santa Catarina no momento da coleta, sendo excluídos do estudo os cães que não residiam em Santa Catarina, cães com idade inferior a seis meses de idade, agressivos, cadelas prenhes, cães que não tinham um tutor para assinar o termo de consentimento para coleta (ANEXO III), assim como amostras insuficientes e com soro hemolisado.

4.2 LOCAL DA PESQUISA

Para a execução do projeto foram colhidas amostras sanguíneas de cães nas seis mesorregiões de Santa Catarina (Oeste, Norte, Vale do Itajaí, Serrana, Grande Florianópolis e Sul), de forma a abranger todo o Estado.

Santa Catarina pertence à região Sul do Brasil, situando-se entre os paralelos de 25° 57'26" e 29° 29'04" de latitude sul e os meridianos de 48° 21'39" e 53° 50'15" de longitude oeste de Greenwich. Seu território corresponde a 16,61% da Região Sul e 1,11% da área total do Brasil, possuindo uma área total de 95.913km² (POTTER et al., 2004), contendo 295 municípios e em torno de 7 milhões de habitantes. O bioma predominante é a Mata Atlântica, sendo o Estado que detém o maior percentual de cobertura florestal remanescente deste bioma no Brasil (SFB, 2018).

Segundo a classificação de Köppen, o Estado possui clima mesotérmico úmido, sem estação seca, incluindo dois subtipos, Cfa e Cfb. Cfa corresponde ao clima subtropical, com verões quentes, geadas pouco frequentes, com tendência a concentrar as chuvas nos meses de verão e sem estação seca definida. Cfb caracteriza-se por clima temperado propriamente dito, com verões frescos, temperatura média no mês mais quente abaixo de 22°C e sem estação seca definida (PANDOLFO et al., 2002).

4.3 ESTIMATIVA DA POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM

Para a obtenção do número de amostras, a população canina do Estado foi estimada com base no Guia para Manejo de População Canina da WHO (World Health Organization), que estabelece uma proporção de cães por habitante em 1:10 (WHO, 1990). Levando em consideração a população estimada do Estado de Santa Catarina em 2018 (7.188.538 pessoas) (FECAM, 2019), pressupõe-se uma população de 718.853 cães.

Em relação à prevalência admitiu-se um valor de 15%, levando-se em consideração que o Estado de Santa Catarina foi classificado como indene até 2010. Segundo revisão de Arruda et al. (2013), as prevalências de LVC no Brasil podem variar de 1 a 67%. Em uma análise realizada com 1.400 amostras provenientes de áreas endêmicas em quatro Estados brasileiros, o pesquisador obteve a prevalência de aproximadamente 7%. A amostragem total mínima foi constituída de 1225 animais acrescentados mais dois, com erro admitido de 2% e nível de significância de 95%.

O cálculo para a obtenção da amostragem foi baseado na fórmula abaixo (Figura 5).

Figura 6 - Fórmula para obtenção do número de amostras em uma população considerada infinita.

	Variável qualitativa
População infinita	$n = \left(\frac{Z_{\alpha/2} \cdot \sqrt{p \cdot q}}{E} \right)^2$

Legenda: n=tamanho da amostra; Z_{α} =valor crítico para o grau de confiança desejado 1,96 (95%); E=erro padrão (admitiu-se um erro padrão de 2%); p=proporção de resultados favoráveis da variável na população; q=proporção dos resultados desfavoráveis na população ($q=1-p$).

Fonte: FONTELLES, (2010).

4.4 REALIZAÇÃO DOS TESTES DE TRIAGEM DPP® E CONFIRMAÇÃO PELO MÉTODO ELISA

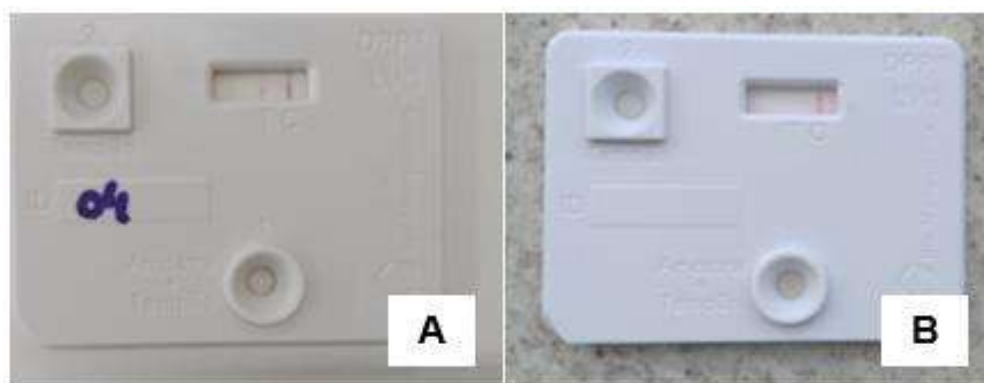
Todas as amostras (n= 1227) foram analisadas pelo teste rápido DPP® (Dual Path Platform) que, de acordo com o protocolo do Ministério da Saúde, é o teste de triagem. Estes testes foram gentilmente cedidos pela Fiocruz Paraná,

Instituto Carlos Chagas (ICC), de Curitiba. O procedimento seguiu as recomendações do fabricante (ANEXO I).

Para sua realização eram adicionados 5µL de soro no poço #1 denominado “Amostra + Tampão”, seguido da adição de duas gotas da solução tampão. Aguardavam-se cinco minutos e quatro gotas de solução tampão eram adicionadas ao poço #2 denominado “Tampão”, com a leitura dos resultados ocorrendo após 15 minutos.

Em animais positivos verificava-se a marcação de duas linhas vermelhas, uma na área de Teste (T) e outra na área Controle (C). Em animais negativos, apenas uma linha vermelha era visível, na área de Controle (C) (Figura 6).

Figura 7 - Teste DPP positivo (A) e negativo (B).



Fonte: Própria do autor (2022).

As amostras positivas ao teste DPP® foram encaminhadas ao LACEN (Laboratório Central de Saúde Pública) em Florianópolis, Santa Catarina, para realização do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para confirmação. O protocolo utilizado pelo LACEN seguiu as recomendações do fabricante (ANEXO II - Ministério da Saúde, Bio-Manguinhos), estando de acordo com Arruda et al. (2016) e Lira et al. (2006).

As amostras foram diluídas (PBS, pH 7,2) a 1:20, em duplicatas, com a positividade sendo determinada pela padronização do teste. A linha de corte entre amostras consideradas positivas (reativas) e negativas (não reativas) foi calculada tendo-se como base a média de leitura dos soros negativos mais dois

desvios padrão. No LACEN, todas as amostras eram novamente submetidas ao teste DPP® antes da realização do método ELISA.

No presente estudo, foram consideradas positivas as amostras reagentes ao DPP e confirmadas pelo ELISA.

4.5 REALIZAÇÃO DE NECROPSIA, TÉCNICAS DE PCR, HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS CASOS POSITIVOS

Três cães que tiveram amostras coletadas para as técnicas sorológicas (DPP® + ELISA) apresentaram sorologia reagente para LV e, de acordo com as medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2014), foram submetidos à eutanásia de acordo com os procedimentos previstos na Resolução n.º 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Um quarto animal, de Rio do Sul, também positivo no teste DPP® mas não no ELISA, morreu de causas naturais devido à evolução do quadro clínico.

Estes animais foram identificados como canino 1 (município de Cocal do Sul), canino 2 (município de Palhoça), canino 3 (município de Rio do Sul) e canino 4 (município de Orleans).

Todos os quatro animais foram necropsiados e amostras de órgãos (fígado, baço, linfonodo poplíteo e pele) foram coletadas e submetidas às técnicas de PCR, imuno-histoquímica e histopatologia (H&E convencional). A técnica de PCR foi gentilmente desenvolvida pelo Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Paraná, Curitiba.

Para a realização da técnica de PCR o DNA foi extraído de fragmento de lesão utilizando-se o “kit” DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen®), na plataforma semiautomatizada de extração de ácidos nucleicos Qiacube (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA purificado foi identificado e estocado a -20°C. A quantificação de DNA por fluorimetria é uma técnica que permite a quantificação de DNA utilizando corantes fluorescentes, que são detectados pela plataforma Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen®) quando utilizado o “kit” Qubit® dsDNA HS Assay, seguindo as instruções do fabricante. Para a quantificação, inicialmente foram estabelecidas curvas de concentração de DNA utilizando os dois padrões do “kit”, sendo que um representou o menor

ponto da curva (padrão 1) e o outro o maior (padrão 2). A solução de trabalho foi preparada em um microtubo, utilizando-se 199 µL de tampão Qubit e 1 µL de reagente Qubit para cada amostra. Para a preparação dos padrões da curva (padrão 1 e padrão 2) foram adicionados 190 µL da solução de trabalho e 10 µL do padrão 1 ou 2, respectivamente, sendo as preparações homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente por dois minutos. Para a quantificação das amostras, foram adicionados 199 µL da solução de trabalho e 1 µL da amostra de DNA a ser quantificada e incubada a temperatura ambiente por dois minutos. Após a leitura no fluorímetro, a concentração de DNA em nanogramas por microlitro (ng/µL) foi definida através da curva-padrão, sendo os valores registrados. Após a extração, as amostras foram amplificadas utilizando sondas de hidrólise (sistema TaqMan®) na plataforma StepOne™ (Applied Biosystems®, by Thermo Fischer Scientific®, MA, EUA). Cada amostra foi testada em triplicata.

A sonda de hidrólise (TaqMan® MGB) e o PCR foram desenhados visando as regiões conservadas do kDNA de *L. infantum*. Os Iniciadores LEISH-1 (5'- AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'- ACCCCCAGTTTCCCGCC3') e a sonda de hidrólise (FAM-5'AAAAATGGGTGCAGAAAT- 3'- NFQ -MGB) utilizados foram descritos anteriormente no protocolo de Francino e colaboradores (2006). O volume final da reação foi de 25 µL, 5 µL de amostra e 20 µL de mix contendo 12,5 µL de Universal Mastermix (Applied Biosystems®, by Thermo Fischer Scientific®, MA, EUA), 1,5 µL dos iniciadores LEISH-1 e LEISH-2 a 900 nM e 2,5 µL da sonda a 200 nM e 2 µL de água ultrapura. O protocolo dos ciclos foi: 1 ciclo de 50° C por 2 minutos, 1 ciclo de 95° C por 10 minutos e 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e de 60° C por 1 minuto. A reação foi realizada em placa de 48 poços (Applied Biosystems®, by Thermo Fischer Scientific®, MA, EUA) que foi vedada com filme adesivo (Applied Biosystems®, by Thermo Fischer Scientific®, MA, EUA) após a pipetagem da reação. Para a quantificação, em cada placa foi utilizada uma curva padrão confeccionada com cultura de *L. infantum* representando os pontos de 2.500, 250, 25, 2,5, 0,25 Equivalente genômico (gEq) de *L. infantum*/reação de qPCR (SOLCÀ et al., 2014; CAMPOS, et al., 2017). Em cada amplificação foram usados controles positivos e negativos e o threshold determinado foi de 0,1 para todas as amostras, pela determinação do ponto em que a fluorescência

emitida ultrapassou o limite considerado negativo. O limite para a obtenção dos resultados detectáveis foi fixado em 37 ciclos. As amostras que apresentaram sinal de fluorescência após o ciclo 37 foram consideradas indetectáveis.

As técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica foram gentilmente desenvolvidas pelo Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Fragmentos de baço, fígado, linfonodo poplíteo, pele (com ou sem lesões) e medula óssea obtidos na necropsia foram armazenados a -20°C, para a PCR, ou formalina tamponada a 10% (sem conservantes), para a histopatologia e Imunohistoquímica (IHQ) até o processamento.

Para a histopatologia, a técnica empregada (BOECHAT et al., 2016) constituía coloração convencional por Hematoxilina e Eosina, de acordo com Mayer (1903). Os fragmentos de tecidos foram acondicionados em tubos de polipropileno com volume de 1,5 mL, contendo formalina tamponada a 10%. Esses fragmentos foram desidratados e emblocados em parafina. Cortes histológicos de 5µm obtidos dos blocos de parafina foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para posterior observação em microscópio óptico. O diagnóstico definitivo foi realizado pela visualização de formas amastigotas de *Leishmania* spp. As formas amastigotas possuem formato ovalado ou arredondado, contendo um núcleo e um cinetoplasto, podendo ser visualizadas no interior de macrófagos ou livres. Na histopatologia (HP), o núcleo e o cinetoplasto se coram de azul escuro e o citoplasma é fracamente eosinofílico (GENARO, 1995). O exame das lâminas foi realizado em microscópio óptico em grande aumento (1000 X).

Para IHQ foi empregada a técnica descrita por Magalhães (2021). As etapas envolvem obtenção da amostra biológica, fixação, processamento, microtomia, recuperação antigênica, bloqueio de substâncias endógenas, aplicação de anticorpos e cromógenos, análise histológica, interpretação e diagnóstico. Didaticamente, essas etapas são divididas em fases. A fase pré-analítica se relaciona com a amostra em sua origem e ao processamento do material tecidual a fim de garantir a qualidade da amostra para o exame. A fixação do tecido é uma etapa crucial da técnica e visa garantir sensibilidade suficiente dos reagentes para a marcação imuno-histoquímica e análise dos resultados. Um maior ou um menor tempo de exposição da amostra ao fixador,

por exemplo, pode afetar a reação antigênica. Já a fase analítica, engloba a escolha de anticorpos primários e o sistema de visualização. A recuperação antigênica pode ser obtida por diferentes métodos e uma escolha adequada depende do tempo de fixação, do tipo de fixador e da natureza do antígeno e do anticorpo. A sensibilidade da reação imunológica pode depender principalmente do método escolhido, o que torna fundamental a especialização do laboratório e a padronização dos procedimentos para que esta sensibilidade seja a maior possível. Na fase pós-analítica, é dada a correlação e a interpretação dos resultados imuno-histoquímicos com a clínica do paciente. Nessa fase, a experiência do patologista, ao escolher os reagentes e anticorpos utilizados e o respectivo método padronizado, é importantíssima para a quantificação dos resultados. O exame imuno-histoquímico é um método prático que ao ser realizado com profissionais capacitados, torna-se uma ferramenta diagnóstica poderosa (ALVES et al., 1999).

4.6 GEORREFERENCIAMENTO

Os dados epidemiológicos obtidos dos questionários foram digitalizados em planilhas do programa Microsoft Excel®, versão 2108 e posteriormente inseridas em um Sistema de Informação Geográfica, o software livre QGIS® versão 3.16 Hannover LTR, de 2020.

Para a obtenção das coordenadas geográficas de latitude e longitude de cada endereço foi utilizado o serviço de pesquisa gratuito Google Maps®, da empresa Google.

Para a criação dos mapas foi necessário usar arquivos de “shapefiles” de municípios e rodovias do Estado de Santa Catarina, disponibilizados pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) e inseri-los no QGIS®. As coletas com coordenadas foram então importadas no QGIS® para a criação dos mapas de distribuição das coletas, localização dos casos e intensidade de infecção ou índice de Kernel, também conhecido como mapa de calor.

4.7 CORRELAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

Um Inquérito epidemiológico foi aplicado aos tutores durante as coletas de sangue abordando questões referentes ao ambiente, histórico de vacinação,

uso de métodos repelentes, dentre outras (ANEXO IV), além da coordenada geográfica em cada ponto de coleta.

Como incremento às correlações epidemiológicas foram solicitados ao Laboratório de Entomologia Médica da DIVE de Florianópolis, os dados de captura de flebotomíneos em Santa Catarina durante os anos de estudo (2019, 2020 e 2021). Os dados foram cedidos em planilhas no formato Microsoft Excel.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos questionários epidemiológicos e dos testes sorológicos (ELISA e DPP) analisados em planilhas Microsoft Excel®, utilizando o software Sigma Plot 11 versão 23.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Em geral, foi utilizado teste de Qui-quadrado para comparação dos percentuais das variáveis. Para comparação entre médias pareadas foi utilizado teste t de Student para dados pareados. Os dados foram apresentados como percentuais ou média (+ EPM) e a significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

As análises estatísticas do presente estudo foram realizadas de maneira independente para os resultados do DPP e do ELISA, respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 REATIVIDADE AO TESTE DPP®, ELISA E CORRELAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

No período de estudo foram coletadas 1.227 amostras de sangue de cães, distribuídos nas seis mesorregiões do Estado de Santa Catarina. Para cada mesorregião, a distribuição amostral ficou de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1 - Distribuição amostral de acordo com as seis mesorregiões do Estado de Santa Catarina.

Mesorregião	Número de amostras
Região sul	210
Região da Grande Florianópolis	196
Região Norte	233
Região Planalto	74
Região Oeste	208
Região do Vale do Itajaí	306
Total	1227

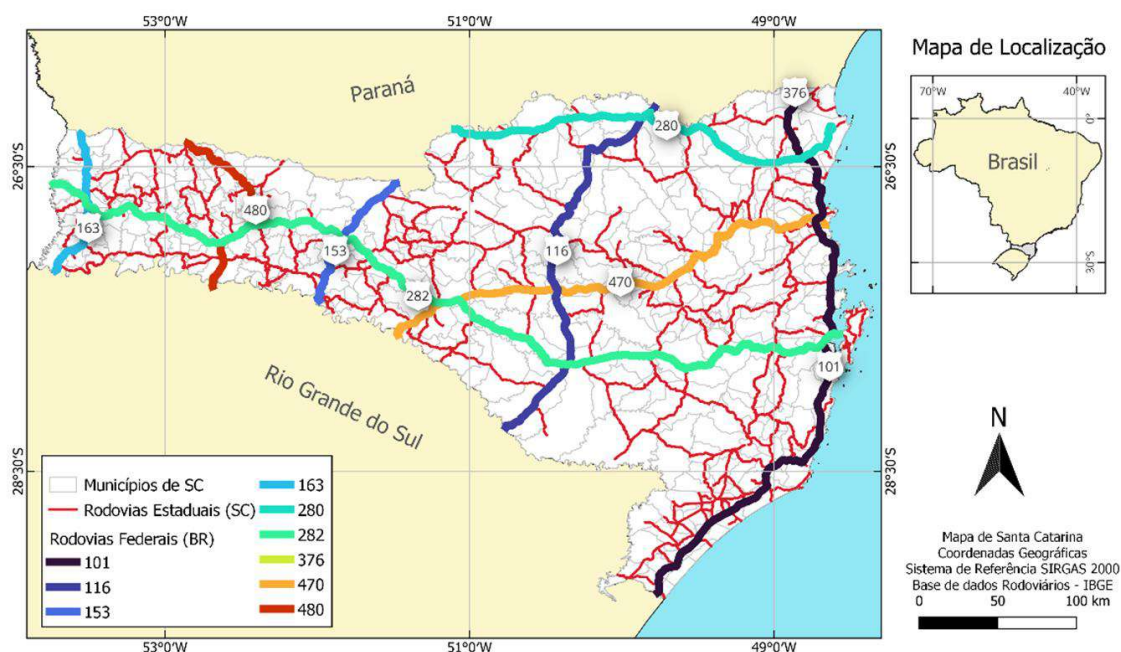
Fonte: Próprio do autor (2022).

No entanto, para melhor explanação dos resultados estatísticos, optou-se por unir as seis mesorregiões em três regiões gerais, a saber a região da Faixa Leste (Grande Florianópolis, Vale do Itajaí, Sul e Norte), a região do Planalto e região do Oeste. É esta divisão que consta no Quadro 3, nas Tabelas 1 e 2 e na discussão dos resultados.

Em cada mesorregião, o critério para a inclusão dos municípios na coleta das amostras foi baseado na rota das principais rodovias estaduais e federais (Figura 7). Estudos demonstraram que a disseminação dos casos de leishmaniose visceral no Estado de São Paulo seguiu o eixo da rodovia Marechal

Cândido Rondon, pois vetor e hospedeiro estão em constante movimento (MATSUMOTO; CASAGRANDE; GUIMARÃES, 2013; CADIM et al., 2016).

Figura 8 - Mapa das principais rodovias que cruzam o estado de Santa Catarina.



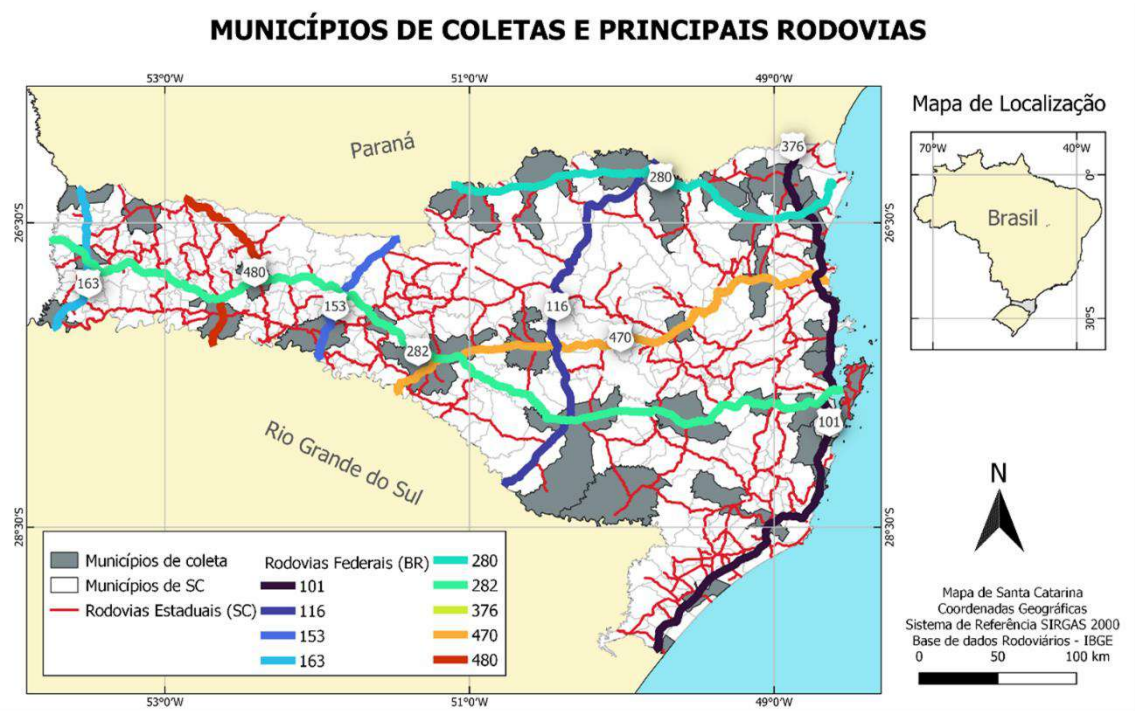
Fonte: Própria do autor (2022).

Além da disseminação estar associada ao fluxo das rodovias, Luz et al. (2001) e Silva et al. (2017) citam que a doença progride em áreas não rurais, com alta densidade populacional, salientando a importância da urbanização no processo da doença.

Por meio deste princípio, os municípios que são cortados e/ou que ficam próximos às principais rodovias federais e estaduais foram selecionados para a amostragem. A população de cada um desses municípios foi dividida pelo total da população de todos os municípios considerados para coleta.

Os municípios e coletas por região ficaram de acordo com a Figura 8 e a distribuição de cães para coleta ficou de acordo com o Quadro 2.

Figura 9 - Mapa de Santa Catarina destacando os municípios em que ocorreram coletas de sangue e as principais rodovias do Estado.



Fonte: Própria do autor (2022).

Quadro 2: Distribuição amostral de acordo com os municípios do Estado de Santa Catarina.

Municípios	Nº de animais
Araquari	8
Araranguá	55
Balneário Camboriú	71
Barra Velha	15
Biguaçu	17
Blumenau	184
Bom Retiro	3
Campo Erê	4
Campos Novos	10
Canoinhas	13
Chapecó	99

Concórdia	34
Curitibanos	11
Dionísio Cerqueira	7
Florianópolis	126
Imbituba	36
Itapiranga	8
Jaraguá do Sul	40
Joaçaba	14
Joinville	132
Lages	43
Mafra	13
Orleans	21
Passo de Torres	7
Paulo Lopes	6
Porto União	8
Rancho Queimado	1
Rio do sul	36
Santo Amaro da Imperatriz	43
São Bento do Sul	19
São Joaquim	7
São Miguel do Oeste	19
Tijucas	9
Tubarão	85
Xanxerê	23
Total	1227

Fonte: Própria do autor (2020).

Das 1.227 amostras, 1,8% (n=22) foram reagentes ao teste de triagem (DPP®) e 0,6% (n=7) foram reagentes ao teste confirmatório ELISA. Em se tratando dos 22 animais positivos no teste DPP®, 32,0% (n=7) tiveram resultado confirmado para *Leishmania infantum* pelo método ELISA realizado pelo LACEN/SC. Um cão foi positivo no DPP® e não confirmou no ELISA, porém, teve resultado reagente para DNA de *L. infantum* na técnica de PCR. Assim,

foram considerados positivos, pelo protocolo do Ministério da Saúde (DPP®+ELISA), apenas sete animais.

Os valores de 1,8% (n=22/1227) de positivos ao teste de triagem (DPP®) e de 0,6% (n=7/1227) no ELISA estão dentro do esperado, uma vez que boa parte das coletas foi realizada em áreas consideradas indenes. Sevá et al. (2021) encontraram ao longo de três anos uma prevalência média de 10,8% em áreas consideradas não endêmicas no estado de São Paulo, valor superior ao observado no presente estudo.

Teixeira et al. (2019) citam 15,4% de positividade no DPP®, com as coletas realizadas em cães assintomáticos de área endêmica. Estes autores salientam a importância de testes sorológicos sensíveis, principalmente em áreas de potencial dispersão para LVC.

Apesar de Figueiredo et al. (2018) enfatizarem que o resultado do teste DPP® é proporcionalmente correlacionado com a sintomatologia dos cães, estes autores encontraram resultados satisfatórios na aplicação do DPP®, inclusive em animais assintomáticos e confirmaram a utilização deste teste para inquéritos sorológicos. Laurenti et al. (2014) também obtiveram bons resultados com a utilização do DPP® como teste sorológico para LVC, detectando em iguais proporções animais sintomáticos e assintomáticos, aumentando as probabilidades de diagnosticar cães verdadeiramente infectados em áreas endêmicas, diminuindo as taxas de eutanásia por resultados falso positivos.

Na Tabela 1 está representada a correlação entre a porcentagem de animais positivos no DPP® e no ELISA de acordo com as variáveis estudadas.

Tabela 1 Porcentagem das variáveis de acordo com os testes DPP® e ELISA para leishmaniose visceral canina no Estado de Santa Catarina, 2022.

Variáveis		Total de animais		Positivos DPP		Positivos Elisa	
		n (1227)	%	n (22)	% ¹	n (7)	% ²
Sexo	Macho	560	45,6	12	2,1	4	10,5
	Fêmea	667	54,4	10	1,5	3	15,8
Idade	Jovem	673	54,8	13	1,9	5	13,5
	Adulto	481	39,2	9	1,9	2	11,1
	Idoso	73	5,9	0	0,0	0	0,0
Região	Faixa Leste	911	74,2	22	2,4	7	12,3
	Planalto	108	8,8	0	0,0	0	0,0
	Oeste	208	17	0	0,0	0	0,0
Procedência	Adotado	1161	94,6	21	1,8	5	9,1
	Comprado	66	5,4	1	1,5	2	100,0
Vacina para LVC	Não	1208	98,5	22	1,8	7	12,3
	Sim	19	1,5	0	0,0	0	0,0
Coleira repelente	Não	1196	97,5	21	1,8	6	10,7
	Sim	31	2,5	1	3,2	1	100,0
Ambiente	Casa/apartamento	735	59,9	7	1,0	3	18,8
	Canil/criadouro	58	4,7	3	5,2	3	75,0
	Abrigo de animais	434	35,4	12	2,8	1	2,7
Hábito	Animal de rua	242	19,7	7	2,9	0	0,0
	Dentro e fora de casa	214	17,4	2	0,9	2	100,0
	Fora de casa	771	62,8	13	1,7	5	11,1
Acesso a rua	Não	471	38,4	3	0,6	3	75,0
	Sim	756	61,6	19	2,5	4	7,5
Sinais Clínicos	Assintomático	1165	94,9	14	1,2	1	2,1
	Oligossintomático	52	4,2	3	5,8	2	50,0
	Polissintomático	10	0,8	5	50,0	4	80,0

¹ Relação entre animais positivos no DPP e o total de animais de determinada variável específica.

² Relação entre animais positivos no ELISA e o total de animais de determinada variável específica dentre os positivos no DPP

Fonte: Própria do autor (2022).

De acordo com os resultados obtidos, dos 22 cães positivos ao teste de triagem (DPP®), apenas sete apresentaram resultado confirmatório no ELISA para LVC, o que corresponde a 0,6% do total de animais avaliados. Mettler et al. (2005) enfatizam que uma alta especificidade é desejável para confirmação de casos suspeitos, enquanto alta sensibilidade é melhor empregada em programas de vigilância ou na testagem de cães provenientes de áreas endêmicas.

Entretanto, Laurenti et al. (2014) citam que o ELISA de Bio-Manguinhos apresentou especificidade baixa (77,8%) muito por conta da reatividade cruzada com outros patógenos.

Nesse contexto, Zanette et al. (2013) citam que a presença de outros agentes infecciosos (*Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Babesia canis*) pode estar associada à reatividade cruzada em testes sorológicos para detecção de LVC, porém Krawczak et al. (2015) reiteram que talvez estes resultados não sejam necessariamente uma reatividade cruzada entre *Leishmania infantum* e outros agentes, mas sim, decorrentes de coinfeções.

Riboldi et al. (2018) não descartam a possibilidade de coinfeções por *Anaplasma* spp. ou resultados falso positivos para LVC em seu estudo na região metropolitana de Porto Alegre (RS), assim como Miró et al. (2013) e Couto et al. (2010) em seus estudos, ambos realizados na Espanha. Esses quadros de coinfeção não só interferem de maneira negativa no diagnóstico, como também podem provocar deleções no quadro imune do animal, um prognóstico pior e dificuldades no tratamento, o que culmina com um cenário de progressão e consequente piora do quadro clínico (BEASLEY et al., 2021).

Estas supostas coinfeções poderiam explicar os resultados da maior sensibilidade do DPP vista neste estudo, não necessariamente interferindo de maneira negativa na especificidade do método ELISA. Infelizmente, a coinfeção com outros patógenos não foi avaliada neste estudo. Novamente, Teixeira et al. (2019) enfatizam que a baixa especificidade dos testes para o diagnóstico de LVC não é tão preocupante quanto a baixa sensibilidade, uma vez que os problemas de especificidade podem estar relacionados a erros de classificação causados por imperfeições nos padrões de referência dos testes, como visto em outros estudos.

Ainda que neste estudo apenas uma coleta tenha sido feita, sugere-se que os cães que foram positivos somente no DPP® possam estar inseridos na condição de cães com “sorologia divergente”, ou seja, cães DPP® positivo e ELISA negativo, ou que estão na zona cinza e que soroconvertem no ELISA tempos depois. Resultados indicam que estes cães positivos somente no teste DPP® podem ser tão infecciosos quanto os animais positivos também no teste confirmatório ELISA, não podendo ser descartada a hipótese de soroconversão por novas infecções por *Leishmania*, uma vez que podem permanecer na área de transmissão e se infectar tempos depois (ROCHA et al., 2020). Por este motivo foi recomendado aos proprietários destes animais o uso de coleiras repelentes e a retestagem seis meses depois por parte da Vigilância Epidemiológica do município de origem do cão. Infelizmente essas ações não foram acompanhadas e posteriormente atestadas neste estudo.

Paltrinieri et al. (2010) apontam que a soroconversão pode ocorrer em média cinco meses após a infecção, variando entre um a 22 meses. Já Solano-Gallego et al. (2005) enfatizam que a soroconversão ocorre muito tempo depois da infecção natural ou nunca, em alguns cães.

No presente estudo, o maior número de cães positivos no DPP® ocorreu em janeiro de 2021 no município de Blumenau, no Alto Vale do Itajaí, onde de 184 amostras, 7 foram positivas mas nenhuma foi confirmada pelo método ELISA. Uma explicação baseia-se no que citam Rocha et al. (2020) onde, em seu trabalho, citam que uma maior prevalência de LVC, 9,6%, foi observada durante períodos de maior infestação de carrapatos nos animais, ou seja, é provável que os patógenos transmitidos pelos carrapatos tenham interferido no diagnóstico de LVC. Greiner e Gardner (2000) reforçam que em testes sorológicos, resultados falso-positivos podem ser induzidos por componentes não alvos, tais como anticorpos provenientes de outras infecções.

Todas as amostras positivas eram retestadas pelo método DPP® no LACEN e os resultados considerados nesta pesquisa se baseiam nestes laudos.

No Quadro 3 estão representados a relação de municípios e os casos positivos e negativos no DPP® e no ELISA, além das técnicas de PCR, histopatologia e imuno-histoquímica.

Quadro 3 - Números de casos positivos e negativos no DPP® e no Elisa nos municípios do Estado de Santa Catarina (N=1227), assim como casos positivos nas técnicas de PCR, histopatologia e imuno-histoquímica.

Região	Municípios	Nº de animais	DPP		ELISA		Histopatológico		Imunohistoquímica		PCR	
			+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Faixa Leste	Tubarão	85	1	84	0	1	*	*	*	*	0	1
	Orleans	21	2	19	2	0	1	1	1	1	2	0
	Passo de Torres	7	0	7	*	*	*	*	*	*	*	*
	Paulo Lopes	6	0	6	*	*	*	*	*	*	*	*
	Tijucas	9	2	7	0	2	*	*	*	*	*	*
	Araranguá	55	1	54	*	1	*	*	*	*	*	*
	Jaraguá do Sul	40	0	40	*	*	*	*	*	*	*	*
	Florianópolis	126	5	121	2	3	*	*	*	*	*	*
	Imbituba	36	0	36	*	*	*	*	*	*	*	*
	Rancho Queimado	1	0	1	*	*	*	*	*	*	*	*
	Santo Amaro da Imperatriz	43	3	40	3	0	1	0	1	0	1	0
	Barra Velha	15	0	15	*	*	*	*	*	*	*	*
	Biguaçu	17	0	17	*	*	*	*	*	*	*	*
	Blumenau	184	7	177	*	7	*	*	*	*	*	*
	Araquari	8	0	8	*	*	*	*	*	*	*	*
	São Bento do Sul	19	0	19	*	*	*	*	*	*	*	*
	Joinville	132	0	132	*	*	*	*	*	*	*	*
	Balneário Camboriú	71	0	71	*	*	*	*	*	*	*	*
	Rio do Sul	36	1	35	0	1	1	0	1	0	1	0
Planalto	Bom Retiro	3	0	3	*	*	*	*	*	*	*	*
	São Joaquim	7	0	7	*	*	*	*	*	*	*	*
	Lages	43	0	43	*	*	*	*	*	*	*	*
	Mafra	13	0	13	*	*	*	*	*	*	*	*
	Curitibanos	11	0	11	*	*	*	*	*	*	*	*
	Campos Novos	10	0	10	*	*	*	*	*	*	*	*
	Canoinhas	13	0	13	*	*	*	*	*	*	*	*
	Porto União	8	0	8	*	*	*	*	*	*	*	*
Oeste	Joaçaba	14	0	14	*	*	*	*	*	*	*	*
	São Miguel do Oeste	19	0	19	*	*	*	*	*	*	*	*
	Xanxerê	23	0	23	*	*	*	*	*	*	*	*
	Itapiranga	8	0	8	*	*	*	*	*	*	*	*
	Dionísio Cerqueira	7	0	7	*	*	*	*	*	*	*	*
	Chapecó	99	0	99	*	*	*	*	*	*	*	*
	Concórdia	34	0	34	*	*	*	*	*	*	*	*
	Campo Erê	4	0	4	*	*	*	*	*	*	*	*

Fonte: Própria do autor (2022).

*= não realizado

Na Tabela 2 estão dispostas as correlações estatísticas entre a positividade dos testes DPP® e ELISA e as variáveis epidemiológicas (sexo, idade, região do estado, procedência, vacinação, uso de coleira impregnada com deltametrina, ambiente, hábito, acesso à rua e sinais clínicos) obtidas por meio da aplicação do questionário.

Tabela 2 - Correlações estatísticas das variáveis de acordo com os testes DPP® e ELISA para leishmaniose visceral canina no Estado de Santa Catarina, 2022.

Tabela 2 – Variáveis		Total de animais ¹		Positivos no DPP				Positivos no Elisa			
		n (1227)	%	n (22)	% ²	% ³	p	n (7)	% ²	% ³	p
Sexo	Macho	560	45,6	12	2,1	54,5	p = 0,397	4	0,7	57,1	p = 0,540
	Fêmea	667	54,4	10	1,5	45,5		3	0,4	42,9	
Idade	Jovem	673	54,8	13	1,9	59,1	p = 0,491	5	0,7	71,4	p = 0,614
	Adulto	481	39,2	09	1,9	40,9		2	0,4	28,6	
	Idoso	73	5,9	00	0,0	0,0		0	0,0	0,0	
Região	Faixa Leste	911	74,2	22	2,4	100,0	p = 0,021	7	0,8	100,0	p = 0,295
	Planalto	108	8,8	00	0,0	0,0		0	0,0	0,0	
	Oeste	208	17	00	0,0	0,0		0	0,0	0,0	
Procedência	Adotado	1161	94,6	21	1,8	95,5	p = 0,861	5	0,4	71,4	p = 0,527
	Comprado	66	5,4	01	1,5	4,5		2	3,0	28,6	
Vacina para LVC	Não	1208	98,5	22	1,8	100,0	p = 0,553	7	0,6	100,0	p = 0,739
	Sim	19	1,5	00	0,0	0,0		0	0,0	0,0	
Coleira repelente	Não	1196	97,5	21	1,8	95,5	p = 0,543	6	0,5	85,7	p = 0,047
	Sim	31	2,5	1	3,2	4,5		1	3,2	14,3	
Ambiente	Casa/apartamento	735	59,9	07	1,0	31,8	p = 0,011	3	0,4	42,9	p = 0,001
	Canil/criadouro	58	4,7	03	5,2	13,6		3	5,2	42,9	
	Abrigo de animais	434	35,4	12	2,8	54,5		1	0,2	14,3	
Hábito	Animal de rua	242	19,7	07	2,9	31,8	p = 0,272	0	0,0	0,0	p = 0,373
	Dentro e fora de casa	214	17,4	02	0,9	9,1		2	0,9	28,6	
	Fora de casa	771	62,8	13	1,7	59,1		5	0,6	71,4	
Acesso a rua	Não	471	38,4	03	0,6	13,6	p = 0,016	3	0,6	42,9	p = 0,807
	Sim	756	61,6	19	2,5	86,4		4	0,5	57,1	
Sinais Clínicos	Assintomático	1165	94,9	14	1,2	63,6	p = 0,001	1	0,1	14,3	p = 0,001
	Oligossintomático	52	4,2	03	5,8	13,6		2	3,8	28,6	
	Polissintomático	10	0,8	05	50,0	22,7		4	40,0	57,1	

Fonte: Própria do autor (2022).

¹Número total de animais testados (positivos e negativos).

²Relação entre os animais positivos dentro de uma categoria e o total de animais de sua categoria.

³Relação entre os animais positivos dentro de uma categoria e o total de animais positivos. $p > 0,05$.

Dos 1227 animais testados, 45,6% eram machos e 54,4% eram fêmeas. Dentre os positivos ao DPP, 2,1% eram machos e 1,5% eram fêmeas. Não houve associação significativa com os testes. Um maior número de machos positivos pode estar associado, segundo Idrissi et al. (2021) e Miranda et al. (2008), ao comportamento errante desta categoria, ficando estes mais disponíveis aos flebotomíneos (ou outros patógenos).

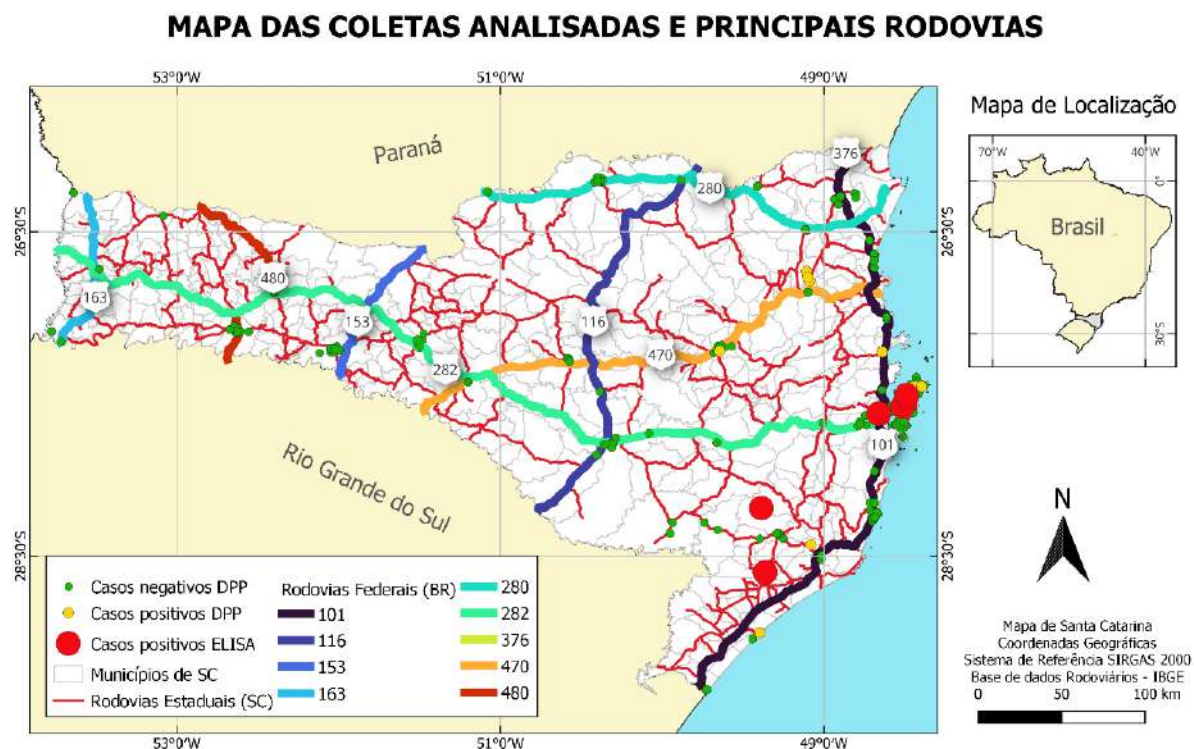
Na variável região, dos 1227 animais, 74,2% eram provenientes da Faixa Leste, 8,8% eram do Planalto e 17% eram da região Oeste. Neste caso, houve associação significativa (Tabela 2) entre as regiões ($p = 0,001$) e resultados positivos no DPP. A região da Faixa Leste concentrou todos os 22 casos positivos ao DPP® e, mesmo sem correlação, também no ELISA.

Um maior número de amostras foi coletado na região da Faixa Leste do Estado por conta do critério para seleção da população e da amostra, ou seja, municípios mais populosos tiveram mais cães coletados. Observa-se, portanto, que os casos positivos ao teste DPP® restringem-se às mesorregiões Vale do Itajaí, Grande Florianópolis e Sul (que no presente estudo foram agrupadas na região da Faixa Leste).

Os casos confirmados pelo método ELISA seguem basicamente os mesmos padrões, sendo provenientes das mesorregiões da Grande Florianópolis e Sul. Para uma melhor visualização, a ferramenta de Georreferenciamento foi utilizada de forma a espacializar os resultados obtidos. Levou-se em consideração o curso das principais rodovias do estado com posterior correlação dos dados epidemiológicos do estudo, além da utilização do índice de Kernel para dimensionar a intensidade dos fenômenos.

Na Figura 9 estão representados os mapas com as coletas analisadas pelos métodos DPP® e ELISA, de acordo com as principais rodovias que cruzam Santa Catarina. Percebe-se que os casos positivos no DPP® e ELISA se concentraram na região da Faixa Leste do Estado.

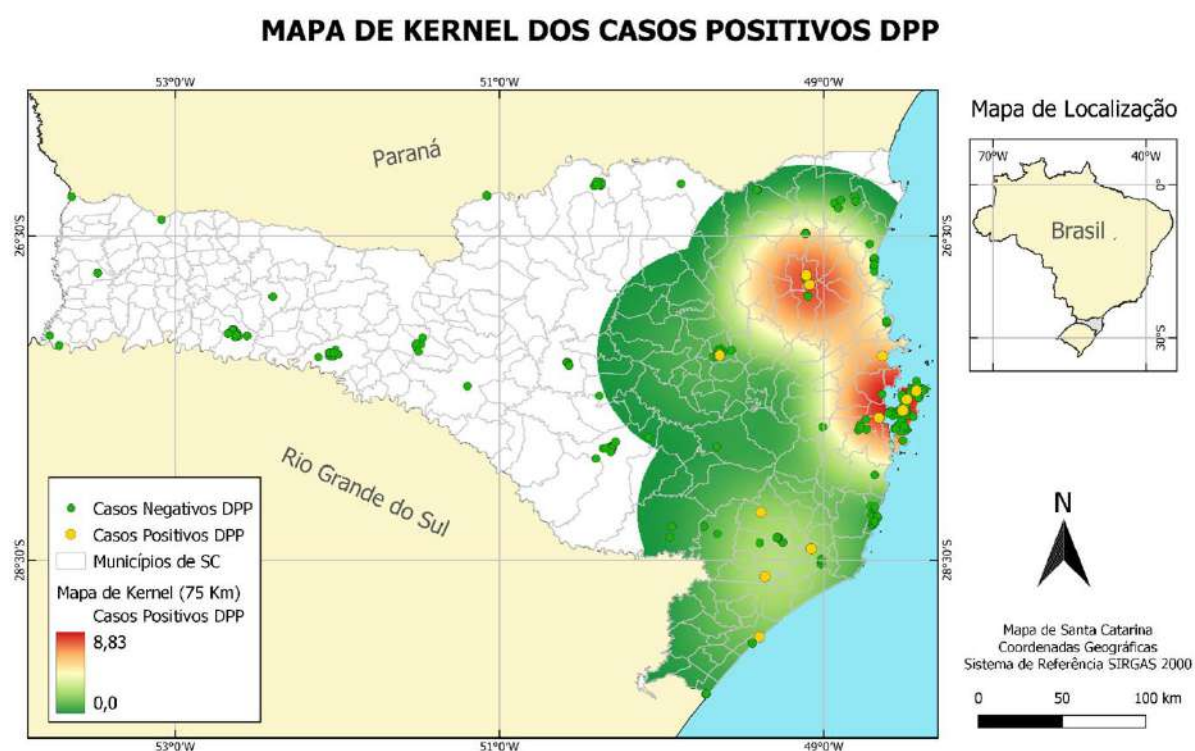
Figura 10 - Representação dos locais de coleta, cidades com casos positivos no DPP® e no ELISA de acordo com as principais rodovias do estado



Fonte: Própria do autor (2022).

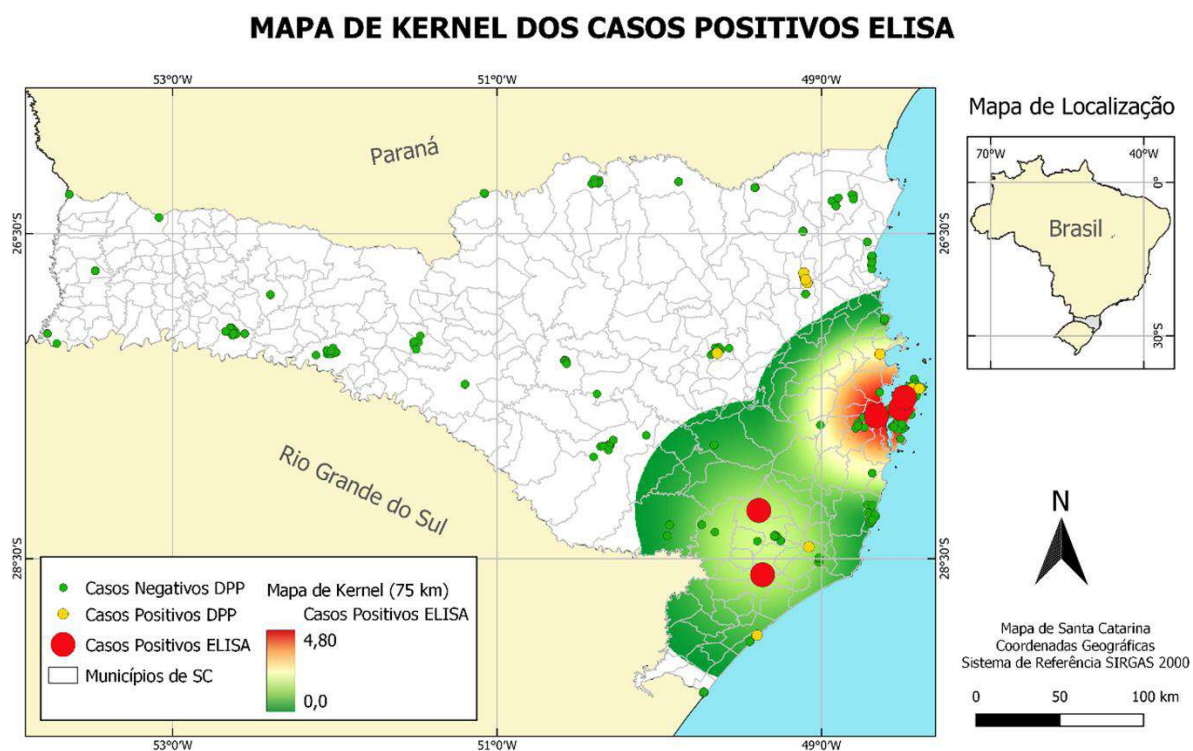
Nas Figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15 estão representados os mapas onde foi empregado o método de Georreferenciamento e o Índice de Kernel de acordo com os resultados analisados e as correlações ambientais. Novamente, a intensidade dos fenômenos representados pelo mapa de calor confirma uma maior concentração dos casos positivos tanto no teste DPP® quanto no teste confirmatório ELISA na região da Faixa Leste do estado.

Figura 11 - Representação utilizando o método de Kernel para as coletas positivas ao método DPP® no estado



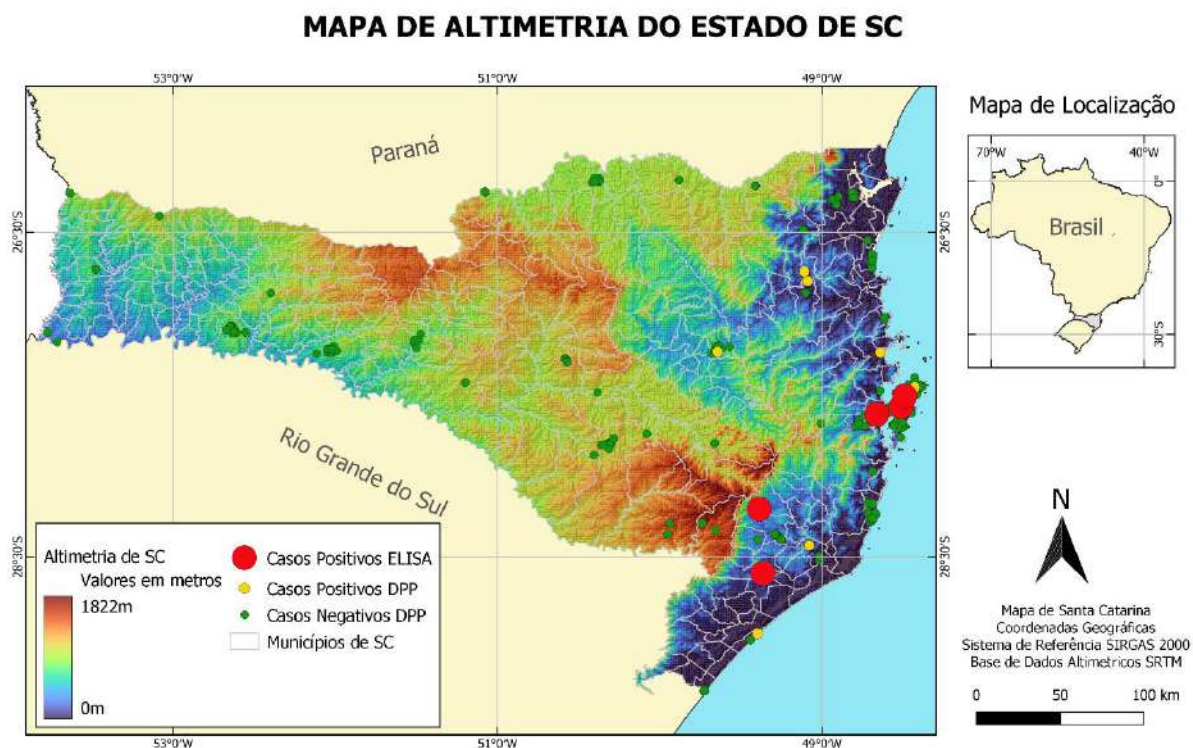
Fonte: Própria do autor (2022).

Figura 12 - Representação utilizando o método de Kernel para as coletas positivas ao método ELISA no estado.



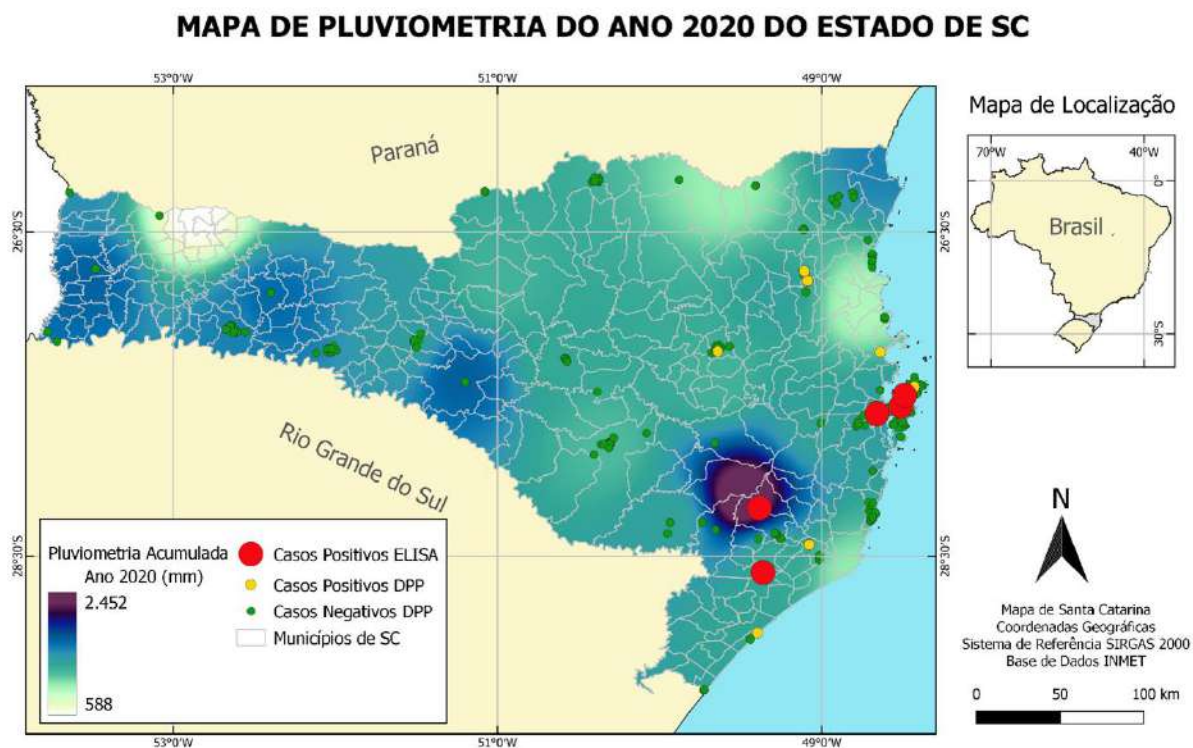
Fonte: Própria do autor (2022).

Figura 13 - Representação utilizando o método de Georreferenciamento para a altimetria no estado de Santa Catarina no ano de 2020 e correlação com os casos DPP e ELISA positivos.



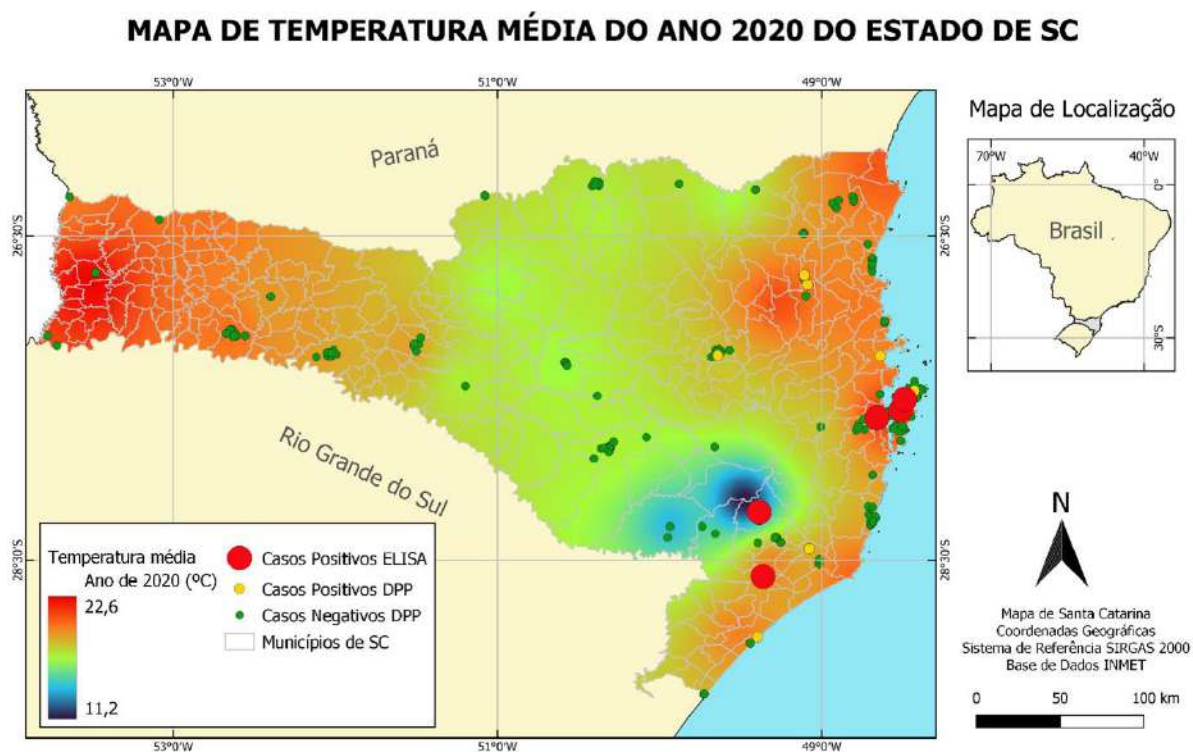
Fonte: Própria do autor (2022).

Figura 14 - Representação utilizando o método de Georreferenciamento para a pluviometria no Estado de Santa Catarina no ano de 2020 e correlação com os casos DPP e ELISA positivos.



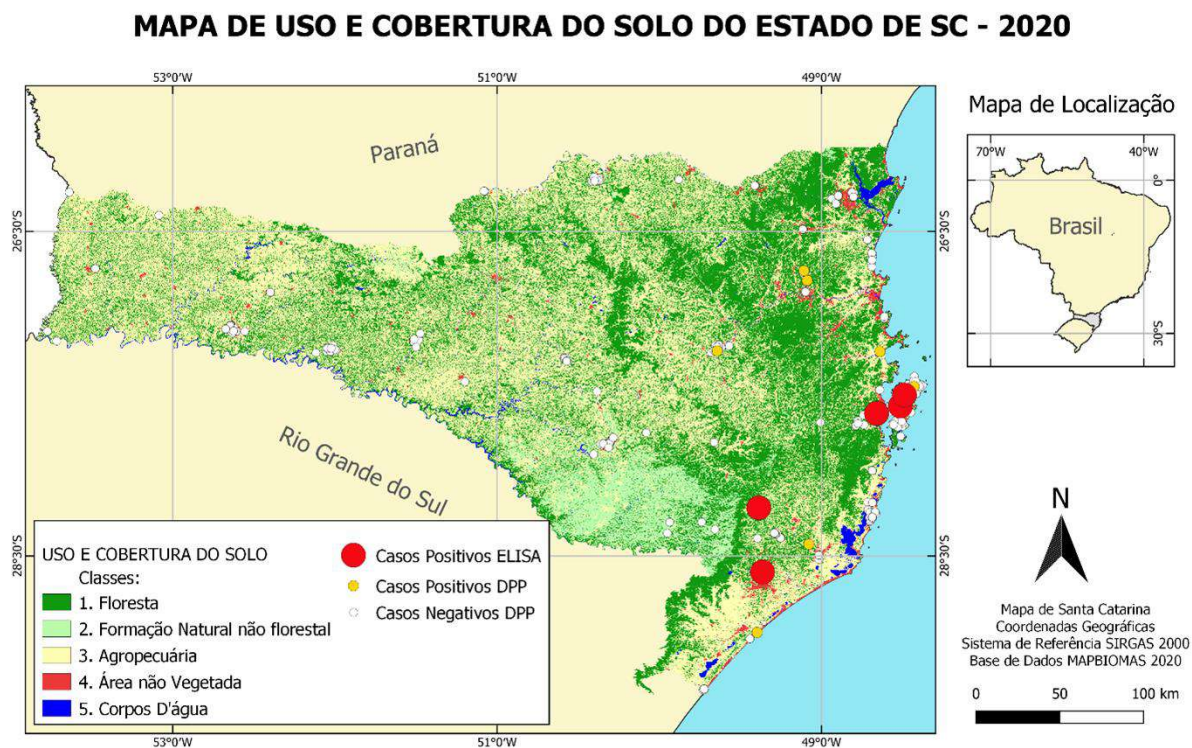
Fonte: Própria do autor (2022).

Figura 15 - Representação utilizando o método de Georreferenciamento para a temperatura média no Estado de Santa Catarina no ano de 2020 e correlação com os casos DPP e ELISA positivos.



Fonte: Própria do autor (2022).

Figura 16 - Representação utilizando o método de Georreferenciamento para uso e cobertura do solo no Estado de Santa Catarina no ano de 2020 e correlação com os casos DPP e ELISA positivos.



Fonte: Própria do autor (2022).

Por meio da observação dos resultados, permite-se supor que os casos de LVC em Santa Catarina ocorrem em maior grau na Faixa Leste do Estado, em áreas de baixas altitudes, com índice pluviométrico médio, de temperatura média mais elevada e em áreas mais populosas e próximas a fragmentos florestais. Isso pode estar associado às condições socioeconômicas e ambientais, tais como maiores fluxos de pessoas e presença da maior rodovia do estado (BR 101) que liga Santa Catarina ao restante do Brasil, além de umidade, precipitação e temperaturas, que podem favorecer a atividade dos flebotomíneos.

O emprego de ferramentas que permitem a espacialização dos casos, bem como a associação a fatores de risco ambientais, pode ajudar as autoridades de saúde pública no planejamento e instituição de medidas de prevenção e controle em áreas

vulneráveis, evitando a disseminação da doença e surtos futuros (PRESTES-CARNEIRO et al., 2019).

Barata et al. (2004) relataram correlação significativa entre precipitação, umidade e número de flebotomíneos coletados em seu estudo, no estado de Minas Gerais. Rutledge e Ellenwood (1975) sugerem que os padrões de chuvas agem modificando as condições de reprodução dos flebotomíneos, interferindo em sua sazonalidade, assim como a densidade populacional tende a diminuir nos meses mais frios e secos e aumentar nos meses mais quentes e úmidos (AGUIAR; SOUCASAUX, 1984), o que pode aumentar o risco de transmissão de *Leishmania* spp. aos animais domésticos e ao próprio ser humano (TEODORO et al., 1993).

Hakkour et al (2020) citam que a urbanização e, principalmente, os fatores ambientais tais como umidade, altitude, temperatura e vegetação, demonstraram forte associação com a ocorrência da doença em seu estudo, desenvolvido no Marrocos.

Ximenes et al. (2007) relataram correlações positivas entre a degradação ambiental litorânea, crescimento urbano desordenado, ocorrência de insetos vetores e condições de saúde humana sobre a incidência das leishmanioses tegumentar e visceral americanas em Natal, no Rio Grande do Norte, área de litoral do nordeste brasileiro. Da mesma forma, Da Silva et al (2017) enfatizam que a persistência da doença em mesorregiões ao Norte do estado de Minas Gerais pode estar associada aos fatores socioeconômicos e ambientais.

Além disso, estudos apontam que diversas espécies de flebotomíneos apresentam alta capacidade de adaptação e sobrevivência em ambientes alterados (MARINHO et al., 2008), inclusive ocorrendo em alta densidade em ambientes artificiais (GOMES; GALATI, 1989), caracterizando-se como importantes agentes transmissores de diferentes espécies de *Leishmania* (OLIVEIRA et al., 2010).

Outro fator preponderante é que Santa Catarina possui um litoral muito visado por turistas de outros estados e países. Milhares de pessoas visitam a capital Florianópolis todos os anos durante a temporada de verão, muitas vezes vindo de áreas endêmicas e não endêmicas e conjuntamente trazem seus cães para passarem os meses de férias (dezembro a fevereiro). Esses deslocamentos podem ter facilitado a introdução do parasita no estado e inclusive, sua disseminação para outros municípios além de Florianópolis (STEINDEL et al., 2013).

A introdução de cães infectados em determinadas áreas pode estar associada à migração, uma vez que estes animais, muitas vezes, são trazidos infectados da

região de origem, contribuindo para a infecção dos flebotomíneos presentes em áreas de desmatamento recente e em zonas periurbanas (MESTRE; FONTES, 2007; THOMAZ-SOCCOL et al., 2009). O turismo, muitas vezes desenvolvido sem planejamento, pode predispor a aproximação de flebotomíneos com as habitações rurais e urbanas, muito por conta da degradação ambiental que desequilibra os ciclos enzoóticos de determinadas infecções, como é o caso da leishmaniose (REBÊLO et al., 2010).

Na região Oeste do Estado de Santa Catarina, alguns estudos já demonstraram a ocorrência de casos positivos confirmados de LVC. É o caso de um estudo realizado em São Miguel do Oeste e Descanso, no extremo Oeste do Estado, onde os dados obtidos confirmaram a presença da doença nestes municípios e demonstraram a possível ocorrência de um surto da doença em cães com o envolvimento de humanos em casos futuros (MAZIERO et al., 2014).

No Meio-Oeste, Pinto et al. (2022) identificaram os primeiros casos positivos de LVC, onde de 126 cães avaliados, 16,7% foram positivos no teste ELISA, 11,9% na RIFI e 7,1% apresentaram amplificação específica para *Leishmania infantum* na técnica de PCR.

Devido à proximidade de Santa Catarina com o Estado do Paraná e por possuir rotas rodoviárias diretas de ligação, a situação epidemiológica de LVC é relevante para ambos os Estados. Neste sentido, em um estudo na região do extremo Oeste do Paraná foram identificadas três possíveis rotas de disseminação da LVC no Centro-Sul do Brasil. Uma delas reporta-se ao surgimento de um novo cluster de *Leishmania infantum* no Oeste do Estado de Santa Catarina e sua dispersão para o sul do Estado do Paraná, especificamente no município de Pato Branco após 2013 (PASQUALI et al., 2019).

A região da tríplice fronteira (Brasil, Argentina e Paraguai) no Estado do Paraná, apresentou nos últimos anos crescente aumento no número de casos de LV humana e canina autóctones, tornando esta região importante fonte da doença para os municípios, Estados e países vizinhos (THOMAZ-SOCCOL et al., 2018). Neste sentido, as características epidemiológicas envolvendo vetores e hospedeiros tornam a região do extremo Oeste do Paraná endêmica para LVC, sugerindo um cenário preocupante. Os sistemas de vigilância de fronteiras são essenciais para atuar no combate desta doença silenciosa para outras regiões (THOMAZ-SOCCOL et al., 2017).

No quesito uso de coleira repelente, os resultados do teste ELISA apresentaram correlação ($P < 0,01$) (Tabela 2), sendo que dos sete animais positivos no teste de ELISA, seis animais (85,7%) não utilizavam coleira. Alguns autores citam que a vacinação contra LV (apesar de discutível) e o uso de coleiras repelentes correspondem às formas mais eficazes de prevenção e controle da doença (MIRÓ et al., 2008; RIBEIRO et al., 2018).

Inclusive, em se tratando de políticas públicas, o uso de coleiras impregnadas com inseticida demonstra ser o melhor método de prevenção, pois age diretamente sob a força de infecção e o contato vetor-cão, além de ter fácil aplicação e melhor aceitação por parte da população (SEVÁ et al., 2016).

Dos 22 animais positivos no DPP®, doze animais eram provenientes de abrigo (54,5%), três animais eram de canil/criadouro (13,6%) e sete de casa/apartamento (31,8%). Para essa variável os testes de DPP® e ELISA apresentaram associação ($p = 0,0001$). No caso do DPP, dos animais positivos, 54,5% eram de abrigo. Animais de abrigo, por suas condições de vida, são normalmente mais expostos às infecções em geral. Entretanto, no caso do ELISA, embora correlação tenha sido evidenciada, os resultados, contraditoriamente, indicam maior proporção de positivos entre os animais de casa/apartamento ou de canil/criadouro, que representam 42,9% dos positivos, para ambos os tipos de ambiente (Tabela 2).

Em relação à variável acesso a rua, dos 1227 animais testados, 38,4% não tinham acesso à rua e 61,6% tinham acesso à rua. Três animais que não tinham acesso à rua foram positivos no DPP® (0,6%) e 19 animais com acesso à rua foram positivos no mesmo teste (2,5%). Foi verificada correlação entre resultado positivo ao DPP e o acesso à rua, com 86,4% dos positivos nessa técnica tendo acesso à rua (Tabela 2).

Muitos dos animais dos quais foi coletado sangue eram de abrigo ou em situação de rua. Isso se deve ao fato de que os Setores de Vigilância Epidemiológica dos municípios nos auxiliaram na obtenção de contatos para as coletas, que muitas vezes eram de animais cujos tutores recolhiam e abrigavam cães em suas casas ou em ONGs (Organizações Não Governamentais). Também foram realizadas coletas em UVZs (Unidade de Vigilância em Zoonoses), assim como em cães domiciliados, em maior quantidade.

Naveda et al. (2006) relacionam o livre trânsito e a ausência de moradia a uma maior exposição aos vetores e a outros animais infectados, sendo estes cães

considerados potenciais fontes de disseminação tanto de LVC quanto de outras doenças para os seres humanos.

Shokri, Fakhar e Teshnizi (2017) encontraram 10% de prevalência em cães errantes contra 6% em cães que possuíam tutores no Irã, assim como Parker et al. (2021) que relataram uma soroprevalência de 38,6% em cães abandonados contra 20,1% em cães domésticos em Posadas, província de Misiones, Argentina. Miró et al. (2013) encontraram soropositividade significativamente maior para *Leishmania infantum* em cães que viviam ao ar livre.

Em relação à procedência dos cães positivos no ELISA do presente estudo, um havia sido encontrado abandonado em um município do Sul do estado com lesões de pele e foi adotado, não sendo possível saber qual sua real procedência. Um segundo cão positivo era proveniente da região Oeste de Santa Catarina, mas já fazia dois anos que residia no sul do Estado. Outro cão, este de Florianópolis, era de um abrigo municipal e os quatro animais restantes, todos da região da Grande Florianópolis, possuíam histórico de residência desde o nascimento.

Analisando estas informações, é possível perceber que alguns animais vieram ou poderiam ter vindo de outras áreas do Estado ou até mesmo de outros Estados ou países, o que segundo alguns autores caracteriza-se como uma situação problemática para o controle da doença. Os fenômenos migratórios que facilitam a chegada de cães infectados em áreas indenes (CARRANZA-TAMAYO et al., 2010), aliados ao fato de que alguns proprietários são contrários à eutanásia e acabam transferindo seus animais positivos para áreas distantes onde não ocorre a doença, favorecem a dispersão da LVC e colaboram com o processo preocupante de expansão atualmente observado (FIGUEIREDO et al., 2012).

Quanto aos sinais clínicos, 94,9% foram considerados assintomáticos e destes, 14 animais (1,2%) foram positivos no DPP®. 4,2% foram caracterizados como oligossintomáticos e destes, três (5,8%) foram positivos no DPP®. Cinco animais (0,8%) foram considerados polissintomáticos, sendo que destes, cinco (50%) foram positivos no DPP®. Essa variável apresentou correlação ($p = 0,001$) com os resultados positivos tanto no DPP quanto no ELISA. Dos cães positivos ao DPP, 63,6% eram assintomáticos e dos sete animais positivos no ELISA, um animal (0,1%) era assintomático, dois animais (3,8%) eram oligossintomáticos e quatro animais (40,0%) eram polissintomáticos (Tabela 2). Nas Figuras 16, 17, 18 e 19 estão representados alguns cães com quadro clínico para LVC.

Figura 17 - Animal 3 apresentando caquexia, alopecia, onicogrifose e lesões de pele em diversos graus (Rio do Sul).



Fonte: Própria do autor (2022).

Figura 18 - Animal 2 apresentando descamação furfurácea da pele e emagrecimento (Palhoça).



Fonte: Própria do autor (2022).

Figura 19 - Animal 1 apresentando lesões de pele e onicogrifose (Cocal do Sul).



Fonte: Própria do autor (2022).

Figura 20 - Animal 4 apresentando descamação furfurácea da pele (Orleans).



Fonte: Própria do autor (2022).

Sobre os sinais clínicos apresentados, os cães foram classificados, de acordo com o proposto por Queiroz et al. (2010) e Assis et al. (2010), em assintomáticos (sem sinais clínicos), oligossintomáticos (até três sinais clínicos ou comprometimento de até três órgãos) e polissintomáticos (mais de três sinais clínicos ou com mais de três órgãos acometidos). Leote et al. (2021) encontraram 85% de animais assintomáticos em pesquisa realizada no Sul de Santa Catarina, nos municípios de Tubarão e Criciúma.

Os animais considerados sintomáticos apresentam emagrecimento, linfadenopatia, esplenomegalia, alopecia, apatia, ulcerações por todo o corpo, assim

como na região das orelhas e bordas nasais, descamação furfurácea da pele e onicogribose (MARZOCHI et al., 1985; CIARAMELLA et al., 1997; FURTADO et al., 2015), sendo que muitas vezes a pele pode corresponder ao sistema com maior grau de acometimento (ASSIS et al., 2010) e detendo os sinais clínicos mais importantes em quadros de leishmaniose visceral canina (LIMA et al., 2004). Em nossos resultados, quadros de alopecia, dermatite esfoliativa e úlceras de pele foram os sinais clínicos mais encontrados, seguidos de emagrecimento, alterações oftálmicas e linfadenomegalia.

Outra classificação diz respeito aos cães identificados como oligossintomáticos, que são aqueles que apresentam sinais leves da doença, tais como adenopatia linfóide, perda de peso moderada e pelos opacos (MANCIANTI et al., 1988).

Os animais assintomáticos são considerados um problema no que diz respeito ao controle da LV pois têm um alto potencial de se tornarem fontes de infecção aos flebotomíneos, além de que estes animais assintomáticos são a maioria na população (SILVA et al., 2005; DANTAS-TORRES; BRITO; BRANDÃO-FILHO, 2006).

Um dos cães avaliados em nossa pesquisa apresentava quadro clínico compatível com LVC (polissintomático), reagindo ao DPP® mas não confirmando no ELISA. Este mesmo cão morreu devido ao estado grave ao qual se encontrava e amostras de órgãos foram enviadas para realização de PCR, imunohistoquímica e histopatologia, onde houve confirmação da doença. Uma possível explicação para a não reatividade ao ELISA pode estar associada a um atraso entre a infecção e a soroconversão, além de que uma fração de cães podem ser infectados e nunca soroconverterem devido à resposta imune inata, conforme Dye et al. (1993).

Quinnell et al. (2001) relataram que em seu estudo a sensibilidade da sorologia variou durante o curso da doença, sendo mais baixa no momento da infecção e alta (93-100%) depois disso. A possibilidade de um falso-negativo neste caso também não pode ser afirmada, já que para este resultado é preciso imunossupressão (MANNA et al., 2004), o que novamente não explica a positividade ao teste DPP®. Sugere-se, portanto, que possa ter ocorrido algum viés com o teste ELISA empregado pelo LACEN, levando-se em consideração as condições de laboratório, armazenamento e partida dos testes.

Nas técnicas de histopatologia (HE) e imuno-histoquímica o animal apresentou lesões que confirmaram a infecção por *L. infantum*. Traçando um paralelo

entre estes resultados e a não reação ao ELISA, Assis et al. (2010) citam que 85,0% dos tecidos positivos pela HE e pela imuno-histoquímica pertenciam a cães com altos títulos de anticorpos, o que novamente não explica o ELISA negativo neste caso.

Nesse sentido, Riboldi et al. (2018), na região metropolitana de Porto Alegre, encontraram alguns resultados semelhantes, onde algumas amostras consideradas positivas no DPP®, mas negativas no ELISA, também foram confirmadas por PCR em tempo real. Eles citam o que Laurenti et al. (2014) já abordaram anteriormente, de que o ELISA Bio-Manguinhos em seu estudo apresentou uma boa sensibilidade (90,6%), porém uma baixa especificidade (77,8%), podendo este resultado estar relacionado ao tipo de antígeno utilizado no teste. Arruda et al. (2016) encontraram, isoladamente, sensibilidade de 91,8% e especificidade de 83,4% no método ELISA Bio-Manguinhos. Coura-Vital et al. (2013) enfatizam que os testes moleculares podem detectar a infecção antes da soroconversão, sugerindo que cães positivos na PCR devem ser monitorados sorologicamente.

Nas variáveis idade (jovem, adulto e idoso), procedência (adotado ou comprado), vacina (sim ou não) e hábito (animal de rua, dentro e fora de casa e fora de casa) os resultados tanto para DPP® quanto para ELISA não apresentaram correlações estatísticas.

5.2 ANATOMOPATOLOGIA, TÉCNICAS DE PCR, HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS CASOS POSITIVOS

Ao todo, dos sete cães positivos para *Leishmania infantum* no teste confirmatório (ELISA), três foram submetidos à eutanásia. Um cão não teve resultado confirmado no ELISA, mas acabou morrendo devido a gravidade do quadro clínico. Este cão foi submetido à necropsia e teve amostras coletadas para a técnica da PCR, obtendo resultados positivo para LVC. No Quadro 4 são descritas as lesões de necropsia dos quatro animais.

Quadro 4 - Descrição das lesões de necropsia de 4 cães positivos nas técnicas DPP®/ELISA.

Caninos	Exame externo	Exame interno
Canino 1	Possuía lesões de escaras, na extremidade das orelhas, e que sangravam com facilidade, dermatite esfoliativa periocular e, no focinho, ulcerações cutâneas e escaras por todo o corpo, aumento dos linfonodos superficiais, membranas mucosas pálidas e onicogrifose.	Esplenomegalia com evidência da polpa branca, além de áreas esbranquiçadas coalescentes no fígado.
Canino 2	Apresentava-se com baixo escore corporal, dermatite furfurácea por todo o corpo, aumento dos linfonodos superficiais, palidez de mucosas e onicogrifose.	Ausência de lesões.
Canino 3	Apresentava-se caquético, com lesões de escaras nas orelhas que sangravam facilmente, úlceras na região do focinho e face, rarefação pilosa, palidez de mucosas, escaras por todo o corpo (especialmente na cabeça) e onicogrifose.	Ausência de lesões.
Canino 4	Apresentava-se apenas com dermatite esfoliativa de grau leve pelo corpo.	Ausência de lesões.

Fonte: Própria do autor (2022).

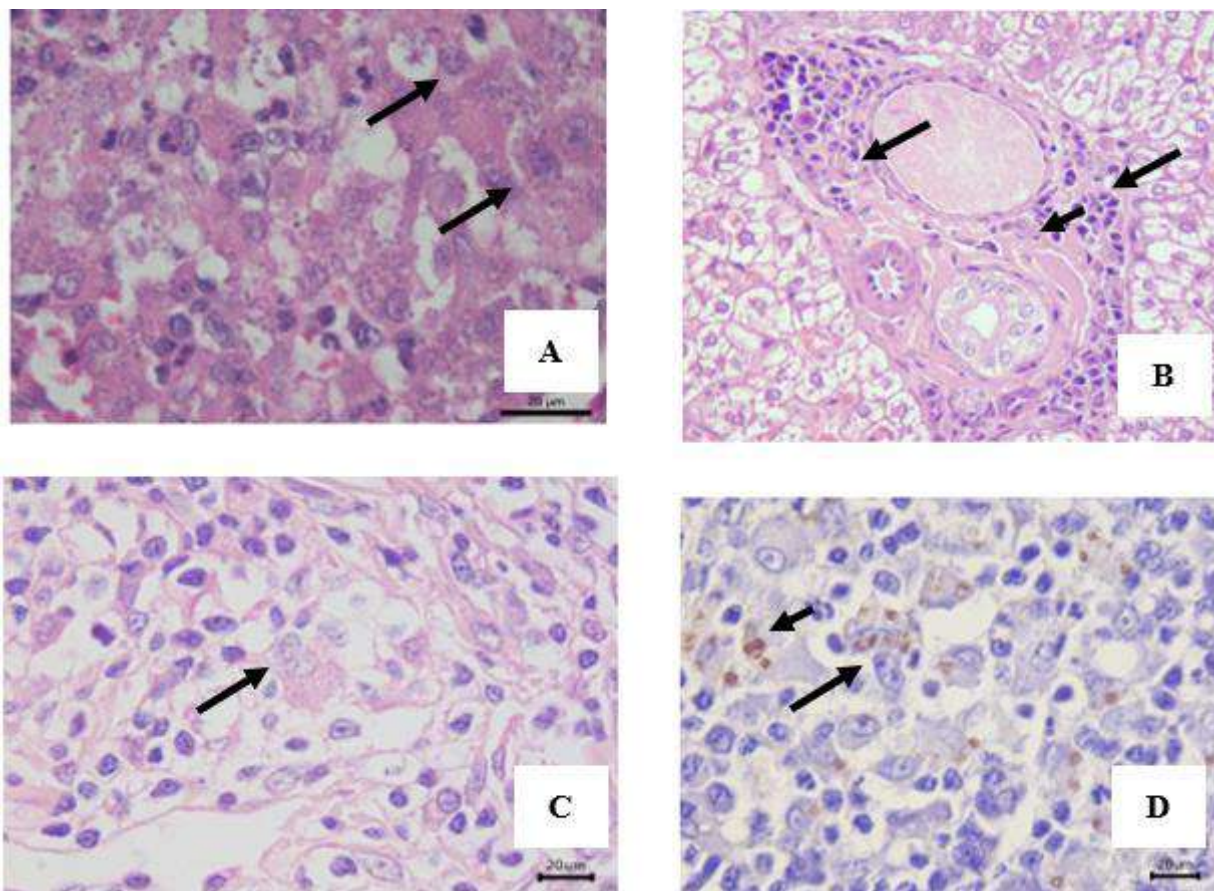
Para a técnica de histopatologia foram coletadas amostras de órgãos, tais como fígado, baço, medula óssea, pele e linfonodo poplíteo, acondicionados em formalina tamponada a 10% e encaminhados ao Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Um dos cães (canino 4) não apresentou alterações nas técnicas de histopatologia e imunohistoquímica. Os resultados dos animais positivos para estas técnicas constam no Quadro 5. Fotomicrografias das lesões histopatológicas e marcações imunohistoquímicas constam na Figura 20.

Quadro 5 - Resultados das técnicas de Histopatologia e Imunohistoquímica dos cães positivos para LVC.

		Canino 1	Canino 2	Canino 3
Fígado	Histopatologia	Hepatite linfo-histiocitária, peri-centrolobular e peri-portal discreta, com infiltrado inflamatório constituído por linfócitos e macrófagos, havendo também plasmócitos	Hepatite granulomatosa discreta, peri-centrolobular e peri-portal. Infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, havendo linfócitos e plasmócitos. Múltiplos granulomas organizados no parênquima.	Morfologia tecidual comprometida.
	Imunohistoquímica	Fígado negativo para formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	Negativo para formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	Morfologia tecidual comprometida
Baço	Histopatologia	Esplenite granulomatosa, moderada multifocal, com granulomas organizados no parênquima.	Morfologia tecidual comprometida.	Morfologia tecidual comprometida.
	Imunohistoquímica	Positivo para formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	Morfologia tecidual comprometida.	Morfologia tecidual comprometida.
Pele	Histopatologia	Dermatite granulomatosa acentuada, perivascular e perianexial. Infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, havendo muitos plasmócitos e linfócitos, com formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. no interior de macrófagos.	Dermatite granulomatosa moderada e multifocal, principalmente perivascular. Infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, havendo plasmócitos e linfócitos em menor número. Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. observadas no citoplasma de macrófagos.	Dermatite e paniculite granulomatosas, difusas e acentuadas. Infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, havendo muitos plasmócitos e linfócitos. Abundantes formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. observadas no citoplasma de macrófagos na derme e tecido subcutâneo.
	Imunohistoquímica	Positiva para formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	Negativo para formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	Positivo para formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp.
Linfonodo poplíteo	Histopatologia	Linfoadenite granulomatosa acentuada e difusa, acometendo a cápsula, regiões cortical, paracortical e medular. Infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, havendo muitos plasmócitos e linfócitos. Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. observadas no citoplasma de macrófagos	Linfoadenite granulomatosa acentuada e difusa, acometendo a cápsula, regiões cortical, paracortical e medular.	Linfoadenite granulomatosa acentuada e difusa, acometendo a cápsula, regiões cortical, paracortical e medular. Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. observadas no citoplasma de macrófagos, em meio ao infiltrado inflamatório.
	Imunohistoquímica	Positivo para formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	Positivo para formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	Positivo para formas amastigotas abundantes de <i>Leishmania</i> spp.,

Fonte: Própria do autor (2022).

Figura 21 - Fotomicrografias de baço, fígado e linfonodo nas técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica de cães positivos para LVC.



Fonte: Própria do autor (2022).

Legenda: A= Baço, formas amastigotas no interior de macrófagos – seta (Hematoxilina e eosina). B = Fígado – Infiltrado peri-portal contendo formas amastigotas no interior de macrófagos – seta (Hematoxilina e eosina). C = Linfonodo – formas amastigotas no interior de macrófagos (seta) (Hematoxilina e eosina) D = Linfonodo – Imunomarcção de formas amastigotas no interior de macrófagos (imuno-histoquímica).

Destes cães foram coletadas amostras de órgãos, tais como fígado, baço, pele, linfonodo poplíteo e medula óssea e encaminhados ao Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Paraná, Curitiba para realização da técnica de PCR. Todos os animais tiveram ao menos um órgão positivo, ou seja, houve amplificação do DNA de *Leishmania infantum*. No Quadro 6 estão representados os cães e seus respectivos resultados para a técnica de PCR.

Quadro 6: Resultado da técnica de PCR para *Leishmania infantum* em 4 cães positivos nas técnicas DPP/ELISA.

Animal - Procedência	Órgãos positivos	Órgãos negativos
Canino 1 – Cocal do Sul	Baço, fígado, pele, fragmento de medula óssea e linfonodo	X
Canino 2 – Palhoça	Baço, fígado, pele, fragmento de medula óssea e linfonodo	X
Canino 3 – Rio do Sul	Baço, fígado, pele, fragmento de medula óssea e linfonodo	X
Canino 4 – Orleans	Baço, pele, fragmento de medula óssea e linfonodo	Fígado

Fonte: Própria do autor (2021).

Dos órgãos coletados na necropsia e enviados para PCR, a pele de todos os cães avaliados encontrava-se positiva para *L. infantum*. Isso é um fator importante a ser considerado quanto à possível transmissibilidade da doença a vetores encontrados no ambiente. Verçosa et al. (2008) encontraram correlação positiva entre o nível de parasitismo da pele e a capacidade de infecção para os flebotomíneos em cães (MANNA et al., 2004), ao contrário de Travi et al. (2001) que observaram que a correlação entre a presença do parasita na pele e a potencial transmissão ao vetor é baixa ou inexistente.

Alguns autores citam que o parasitismo da pele ocorre como um evento tardio durante o curso da doença (TRAVI et al., 2001). Tafuri et al. (2001) relatam que um cão sintomático não apresentou formas parasitárias ao exame da pele, mesmo apresentando diversas lesões clássicas e com confirmação de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em vários órgãos. Furtado et al. (2015) encontraram em seu estudo baixas taxas de detecção de *Leishmania* spp. na pele. Os autores associam estes resultados à menor frequência de infecção ativa por este parasita neste tipo de tecido.

No entanto, Manna et al. (2004) salientam que a biopsia de pele para realização de PCR pode ser considerada um bom método de diagnóstico a campo, em comparação com o aspirado de linfonodos que, em cães saudáveis, pode ser considerado invasivo e inviável. Em concordância, Paparcone et al. (2013) citam que no caso de cães assintomáticos ou que não estejam em estágios mais avançados da doença, a aspiração de linfonodos pode ser difícil devido ao não aumento destes órgãos, apesar de que o tecido dos linfonodos é similarmente rico em parasitas assim como a medula óssea e o baço.

Os métodos ideais para a instituição do diagnóstico seriam as biopsias por punção de medula óssea e linfonodos (TRAVI et al., 2018), contudo, o caráter invasivo que demanda sua obtenção se reflete em uma limitação para seu uso (SOLANO-GALLEGO, et al., 2011). Nesse sentido, Paparcone et al. (2013) desenvolveram uma técnica de coleta de medula óssea esternal que se mostrou promissora no diagnóstico de LVC.

Em resumo, Reis et al. (2013) atentam para a questão de que não há um consenso sobre o melhor método ou tipo de amostra para uso em diagnóstico molecular de larga escala em áreas endêmicas para LVC. Estes pesquisadores defendem o uso de amostras de pele submetidas à técnica de qPCR como o melhor método diagnóstico, isso pelo fato de serem de fácil obtenção e menos invasivas se comparadas às amostras de baço.

Nos quatro cães que foram submetidos à necropsia no presente estudo, durante o exame externo, em todos foi observado ao menos um grau de lesão de pele. Na maioria das vezes caracterizada por dermatite esfoliativa e ulcerações, algumas sangrando com facilidade. Estes achados concordam com os de Assis et al. (2010), que encontraram variados graus de alterações cutâneas nas categorias de cães oligossintomáticos e polissintomáticos avaliados em seu estudo. As úlceras eram na maioria das vezes localizadas nas extremidades das orelhas, o que está de acordo

com Ciaramella et al. (1997). Além das lesões de pele, nos cães necropsiados, a onicogribose foi um achado presente em três dos quatro animais, achado este também encontrado no estudo de Furtado et al. (2015).

Apenas um cão apresentou lesões no exame interno macroscópico, caracterizadas por áreas esbranquiçadas no fígado e evidência da polpa branca do baço. Ciaramella et al. (1997) enfatizam que o comprometimento do baço é uma alteração comum em cães com LV, e as áreas esbranquiçadas no fígado também foram relatadas por Assis et al. (2010). Lima et al. (2019) enfatizam que cães com infecção ativa por *L. infantum* apresentam uma maior frequência de alterações inflamatórias no fígado.

Amostras de órgãos de todos os quatro cães foram submetidas à histopatologia convencional por HE e imuno-histoquímica. No histopatológico as lesões basicamente eram caracterizadas por hepatite linfo-histiocitária, com infiltrado inflamatório de linfócitos e macrófagos, além de hepatite granulomatosa com múltiplos granulomas organizados no parênquima.

Achados semelhantes foram descritos por Lima et al. (2019), onde foram encontrados granulomas no parênquima hepático em 16 de 20 cães estudados. No trabalho de Madeira et al. (2016), 90% dos cães apresentaram granulomas intralobulares. Segundo os autores, estas formações estão associadas à inflamação crônica e à collagenogênese hepática aumentada devido a presença dos parasitas no fígado.

No baço, as lesões consistiam em esplenite granulomatosa com granulomas organizados no parênquima. Este padrão lesional é semelhante ao encontrado por Santana et al. (2008), que enfatizam a perda da arquitetura esplênica com desorganização do tecido linfoide. Este quadro de acometimento esplênico é proporcionalmente maior de acordo com a gravidade do quadro clínico (LIMA et al., 2014).

Na pele, um quadro de dermatite/paniculite granulomatosa acentuada difusa com infiltrado de macrófagos, linfócitos e plasmócitos foi prevalente em todas as amostras. Estes resultados corroboram aqueles relatados por Verçosa et al. (2008) onde o infiltrado inflamatório era constituído principalmente por linfócitos e macrófagos, além da presença de granulomas.

Linfadenite granulomatosa acentuada difusa acometendo a cápsula, região paracortical e medular foi evidenciada em todas as amostras de linfonodos poplíteos,

indo de encontro ao relatado por Lima et al. (2004) e Costa et al. (2008), que citam que os linfonodos mais frequentemente acometidos são os linfonodos cervicais e poplíteos, com infiltrados de macrófagos, linfócitos e neutrófilos ocasionais com áreas medulares preenchidas com infiltrado de células plasmáticas, linfócitos e macrófagos, respectivamente.

Em todos os cães as amostras continham macrófagos com citoplasma repleto de abundantes formas amastigotas de *Leishmania* spp., achados estes que corroboram com Toplu e Aydogan (2011).

Na técnica de imuno-histoquímica, três cães apresentaram resultados negativos no fígado e um cão não teve a técnica realizada devido ao congelamento e consequente comprometimento da morfologia tecidual. A pele foi positiva em dois cães e negativa em dois. O baço foi positivo em um cão e o linfonodo poplíteo foi positivo em três cães (Quadro 5). Esses achados condizem com o relatado por Tafuri et al. (2004), onde citam imunomarcações de formas amastigotas em amostras de fígado e baço, assim como Toplu e Aydogan (2011) que relataram imunomarcações em macrófagos da pele, baço, fígado, linfonodos e medula óssea.

Queiroz et al. (2010) sugerem a utilização da técnica de imuno-histoquímica nas situações em que se deseja confirmar a sorologia, principalmente nos casos em que os cães se apresentam assintomáticos ou oligossintomáticos (TASCA et al., 2009). Neste sentido, diversos autores reforçam a importância da imuno-histoquímica como método auxiliar no diagnóstico da LVC (ASSIS et al., 2010; MENEZES et al., 2016; MAGALHÃES et al., 2021).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS E DO AMBIENTE ONDE FORAM REALIZADAS AS COLETAS

Os cães selecionados para participarem do projeto eram provenientes de diversas regiões do Estado, assim como em cada município eram coletados animais de diferentes ambientes, desde aqueles recolhidos da rua e que estavam alocados em abrigos até animais domiciliados e que viviam no interior de casas e apartamentos.

Muitas vezes a totalidade de amostras de determinado município era obtida em abrigos, pois os cães eram recolhidos de diversos pontos da região. A exemplo disso era a situação de muitos cães que eram resgatados das proximidades de grandes rodovias, considerados pontos estratégicos para abandono de animais.

Foram coletadas amostras de sangue de cães de áreas litorâneas assim como de animais de regiões mais altas do Estado, como no planalto, onde as temperaturas são amenas em grande parte do ano. Nos municípios do interior do Estado, amostras foram coletadas de cães que residiam em áreas rurais, tendo livre acesso às matas e contato com outros animais. Na região do Extremo Oeste também foram obtidas amostras, inclusive em áreas próximas às fronteiras com a Argentina, Rio Grande do Sul e Paraná.

Em grande parte, o estudo obteve amostras de áreas consideradas não endêmicas para a doença, exceto por Florianópolis que é considerada área endêmica para LVC.

5.4 FLEBOTOMÍNEOS

De acordo com os dados do Laboratório de Entomologia Médica da DIVE, foram montadas armadilhas nos municípios de Florianópolis e Monte Castelo no ano de 2019, onde a espécie com maior número de coletas em Monte Castelo foi *Nyssomyia neivai* e, em Florianópolis, *Pintomyia fischeri*. No ano de 2020, Florianópolis foi o único município com armadilhas montadas e as espécies encontradas foram *P. fischeri* e *Migonemyia migonei*. Em 2021, os municípios de Rio do Sul e Pouso Redondo tiveram coletas realizadas e as espécies mais capturadas foram *N. neivai* e *P. fischeri*. O baixo número de coletas realizadas é reflexo da não obrigatoriedade de levantamento da fauna de flebotomíneos, pois Santa Catarina é considerada área não endêmica para LVC.

Em consonância a estes achados têm-se os resultados de Ledo (2021) que, no período compreendido entre agosto de 2019 e julho de 2020, investigou a ocorrência de flebotomíneos do município de Lages, com o uso de armadilhas luminosas do tipo CDC e como resultado não encontrou nenhum espécime durante o período de estudo.

Da mesma forma, Zuchi et al. (2022) desenvolveram uma pesquisa de mestrado muito semelhante, montando armadilhas luminosas do tipo CDC no município de Concórdia, no Oeste do Estado, no ano de 2021. Os resultados apontam a identificação de *M. migonei*, *P. fischeri*, *P. monticola*, *Psathyromyia serie lanei*, *Brumptomyia carvalhoi* e *Brumptomyia* sp.

De acordo com os dados obtidos do Setor de Entomologia da DIVE, percebe-se que *P. fischeri* foi a espécie com maior número de exemplares coletados, principalmente em Florianópolis, área endêmica para LVC, mas ainda sem registros de *L. longipalpis* (DIAS et al., 2013). Similarmente, no estado do Rio Grande do Sul no ano de 2015, foram capturados exemplares de *P. fischeri* infectados por *L. infantum* em um bairro de Porto Alegre, supondo ser esta a espécie vetora neste município, devido à ausência de *L. longipalpis* (RÊGO et al., 2019), assim como Galvis-Ovallos et al. (2017) que sugerem ser *P. fischeri* o potencial vetor de LVC na Grande São Paulo.

Em SC, a espécie *N. neivai* teve exemplares capturados nos municípios de Monte Castelo e Rio do Sul. Esta espécie é bem distribuída no Estado, preferindo áreas de clima mais seco e frio, de acordo com Marcondes, Lozovei e Vilela (1998).

Em estudo realizado por Variza et al. (2021), nos anos de 2015 a 2016 foram capturados sete exemplares da subfamília Phlebotominae das espécies *N. neivai* e *P. fischeri*, nos municípios de Criciúma, Tubarão e Imaruí, todos na região Sul do Estado de Santa Catarina. Imaruí apresentou o maior índice de prevalência para a subfamília Phlebotominae, (quatro exemplares de *N. neivai* e um exemplar de *P. fischeri*). No entanto, nenhuma amostra foi positiva para *Leishmania* spp.

A infecção por *L. infantum* em *L. neivai* foi confirmada em estudos abordando a possibilidade desta espécie ser a transmissora de LV em Florianópolis, teoria esta reforçada pelo fato de ainda não haver registros da presença de *L. longipalpis* neste município (DIAS et al., 2013). Da mesma forma, a infecção por *L. infantum* foi identificada em *L. neivai* no estado de Minas Gerais (SARAIVA et al., 2009).

M. migonei foi outra espécie capturada durante o ano de 2020 no município de Florianópolis pela DIVE e em Concórdia no ano de 2021, onde também foi capturada a espécie *P. serie lanei* (ZUCHI et al., 2022). Na Argentina (MOYA et al., 2015) e no estado de Pernambuco, Brasil (CARVALHO et al., 2010) já foram relatados exemplares de *M. migonei* infectados por *L. infantum*. No estado do Rio de Janeiro, sugere-se que *L. migonei* esteja envolvido na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral em áreas com ausência de *L. longipalpis*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas envolvendo inquéritos sorológicos reforçam a possibilidade de se aperfeiçoar as ações de controle da leishmaniose visceral canina, mas metodologias de suporte devem ser buscadas para que o controle da doença seja efetivo. Essas medidas incluem a participação de clínicas veterinárias para o monitoramento da LVC, a necessidade de acompanhamento e notificação obrigatória dos casos, além de campanhas de conscientização e mobilização dos profissionais da saúde e população em torno do impacto desta importante zoonose (JULIÃO et al., 2007).

Da mesma forma, estudos envolvendo caracterização clínica, biológica e epidemiológica são de extrema importância para a instituição de estratégias de ação e prevenção contra a leishmaniose visceral, principalmente aqueles direcionados à compreensão de quais espécies de vetores são encontradas, seu comportamento e as medidas de vigilância e controle que podem ser adotadas (VARIZA et al., 2021).

Por fim, a associação entre profissionais da clínica médica e do serviço público podem refletir em benefícios para a saúde pública. Essas associações de não somente profissionais da mesma categoria, mas de grupos multidisciplinares, são necessárias e devem ser estimuladas (BEVILACQUA et al., 2001).

8 CONCLUSÕES

- Os casos positivos de LVC, no presente estudo, estão restritos à Faixa Leste do Estado, em áreas de baixas altitudes, com índice pluviométrico médio, de temperatura média mais elevada e em áreas mais populosas e próximas a fragmentos florestais.

- Os casos positivos de LVC exibem associação com o curso da BR 101.

- A soroprevalência de LVC no Estado de Santa Catarina pode ser considerada baixa.

- A utilização de outras ferramentas diagnósticas em associação à sorologia mostrou-se de grande importância na caracterização do status de infecção dos animais.

- O uso das técnicas de Georreferenciamento e do índice de Kernel proporcionou a espacialização dos casos e uma interpretação didática da intensidade da doença.

9 REFERÊNCIAS

- ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALLO, J. Manual de Imuno-histoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.
- ABRANTES, T. R. et al. Environmental factors associated with canine visceral leishmaniasis in an area with recent introduction of the disease in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. 34(1). 2018.
- AGUIAR, G. M. SOUCASAUX, T. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. 1 – Frequência mensal em isca humana (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Vol. 79 (2): 197-209. 1984.
- AHMED, N. H. Cultivation of parasites. **Tropical Parasitology**. 4(2): 80–89. 2014.
- AKHOUNDI, M. et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 10(3). 2016.
- ALMEIDA, A. S. WERNECK, G. L. Prediction of high-risk areas for visceral leishmaniasis using socioeconomic indicators and remote sensing data. **International Journal of Health Geographics**. 13:13. 2014.
- ALMEIDA, A. S. WERNECK, G. L. RESENDES, A. P. C. Object-oriented remote sensing image classification in epidemiological studies of visceral leishmaniasis in urban áreas. **Cadernos de Saúde Pública**. 30(8):1639-1653. 2014.
- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, [s.l.], v. 88, n. 4, p.371-378. 1994.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE** 7(5): e35671. 2012.
- ALVAR, J. YACTAYO, S. BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**. Vol.22 No.12. 2006.

- ANDRADE, H. M. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**. 181. 83–90. 2011.
- ARRUDA, M. M. et al. Validity and reliability of Enzyme Immunoassays using *Leishmania major* or *L. infantum* antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **PLoS ONE**. 8(7): e69988. 2013.
- ARRUDA, M.M. et al. Sensitivity and specificity of parallel or serial serological testing for detection of canine *Leishmania* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 111, n. 3, p.168-173. 2016.
- ASATO, Y. et al. Phylogenic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. **Experimental Parasitology**. 121. 352–361. 2009.
- ASFARAM, S. et al. Is urine a reliable clinical sample for the diagnosis of human visceral leishmaniasis? A systematic review and meta-analysis. **Parasitology International**. 67. 575–583. 2018.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**. 1269-1281. 2000.
- ASSIS, J. et al. Comparative study of diagnostic methods for visceral leishmaniasis in dogs from Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 17-25. 2010.
- BANETH, G. AROCH, I. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. **The Veterinary Journal**. 175. 14–15. 2008.
- BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology** Vol.24 No.7. 2008.
- BAÑULS, A. L. HIDE, M. PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in Parasitology*. Vol. 64. 2007.
- BARATA, R. A. et al. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American Visceral Leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Vol. 99(5): 481-487. 2004.

- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**. 28, 329 – 337. 2006.
- BATES, P. A. ROGERS, M. E. New Insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**. Vol. 4, No. 6. 601-609. 2004.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sandflies. **International Journal for Parasitology**. 37. 1097–1106. 2007.
- BATISTA, L. F. S. et al. An Assessment of the Genetic Diversity of *Leishmania infantum* Isolates from Infected Dogs in Brazil. **American Journal Tropical of Medicine and Hygiene**. 86(5). pp. 799–806. 2012.
- BEASLEY, E. A. et al. Epidemiologic, clinical and immunological consequences of co-infections during canine leishmaniosis. **Animals**. 11, 3206. 2021.
- BENCHIMOL, J. L. et al. Leishmanioses: sua configuração histórica no Brasil com ênfase na doença visceral nos anos 1930 a 1960. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**. Ciências Humanas, Belém, v. 14, n. 2, p. 611-626. 2019.
- BEVILACQUA, P. D. et al. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.53 n.1. 2001.
- BIANCHI, M.V. et al. Leishmaniose Visceral Canina autóctone na região urbana de Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. 44(Suppl 1): 110. 2016.
- BOARINO, A. et al. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 12: 647–653. 2005.

BOECHAT, V.C. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. **Parasitology Research**. 115:2371–2379. 2016.

BOWMAN, D.D. et al. **Georgis - Parasitologia Veterinária**. Tradução da 9a edição (2008). Rio de Janeiro. Elsevier. 2010.

BRAGA, R. R. et al. Leishmaniasis in Brazil. XXII: Characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarem, Pará State. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 80: 143–145. 1986.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota Técnica Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA. 2016. Disponível em: <https://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Disponível em: < https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saud-elegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html

BRASIL. **Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC)**. Nota Técnica Conjunta nº 1, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Brasília. 3p. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (Ed.). **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p. Disponível em: https://repositorio.observatoriodocuidado.org/bitstream/handle/handle/2120/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerai.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 21/05/2021.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. et al. Use of spatial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 1998-1999. **Cadernos de Saúde Pública**. 17(5):1263-1267. 2001.

CAMPOS, M. P. et al. Accuracy of quantitative polymerase chain reaction in samples of frozen and paraffin-embedded healthy skin for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.69, n.6, p.1443-1450, 2017.

CARDIM, M. F. M. et al. Introdução e expansão da Leishmaniose visceral americana em humanos no estado de São Paulo, 1999-201. **Revista de Saúde Pública**. 47(4):691-700. 2013.

CARDIM, M.F.M. et al. Leishmaniose visceral no estado de São Paulo, Brasil: análise espacial e espaço-temporal. **Revista de Saúde Pública**, [s.i.], v. 50, n. 48, p.1-11, 2016.

CARRANZA-TAMAYO, C. O. et al. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 43(4):396-399. 2010.

CARRILLO, E. MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 128. 67–70. 2009.

CARVALHO, K. S. S. et al. Application of next generation sequencing (NGS) for descriptive analysis of 30 genomes of *Leishmania infantum* isolates in Middle-North Brazil. **Scientific Reports**. 10:12321. 2020.

CARVALHO, M. R. et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (Franc, a, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Tropica**. 116. 108–110. 2010.

CASANOVA, C. et al. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* chemotype populations in São Paulo State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 9(3). 2015.

CHAGAS, E. et al. Leishmaniose Visceral Americana: (Relatorio dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 33 (1). 1938.

CHAGAS, E.; CUNHA, A.M.; CASTRO, G.O.; FERREIRA, L.C.; ROMANA, C. Leishmaniose visceral Americana. Nova entidade mórbida do homem na América do Sul. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 32, n. 3, p. 321-480, 1937.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**. 141, 539-543. 1997.

CORREIA, V. R. M. et al. A remote sensing application to investigate urban endemics. **Cadernos de Saúde Pública**. 23(5):1015-1028. 2007.

COSTA, M. M. S. et al. Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: A histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. **Veterinary Pathology** 45:613–616. 2008.

COSTA, S. F. et al. Combined in vitro IL-12 and IL-15 stimulation promotes cellular immune response in dogs with visceral leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 14(1): e0008021. 2020.

COURA-VITAL, W. 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.

COURA-VITAL, W. et al. Risk factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from an endemic area of Brazil. **PLoS ONE** 8(8): e71833. 2013.

COUTO, C. G. et al. Serological study of selected vector-borne diseases in shelter dogs in Central Spain using point-of-care assays. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. V. 10, n. 9, 2010.

CUPOLILLO, E., BOITÉ, M.C., PORROZZI, R. Considerações sobre a Taxonomia do Gênero *Leishmania*. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., and ALVES, C. R., comps. **Leishmanioses do continente americano** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, pp. 39-51. ISBN 978-85-7541-568-9. 2014.

DA SILVA, A. V. A. et al. Detection of amastigotes and histopathological alterations in the thymus of *Leishmania infantum*-infected dogs. **Immunity Inflammation and Disease**. 8:127–139. 2020.

DA SILVA, E. S. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. **Veterinary Research Communications**. 30. 637–643. 2006.

DA SILVA, T. A. M. et al. Spatial and temporal trends of visceral leishmaniasis by mesoregion in a southeastern state of Brazil, 2002-2013. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 11 (10): e0005950. 2017.

DANTAS-TORRES F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary parasitology**.; 149:139-146. 2007.

DANTAS-TORRES, F. BRITO, M. E. F. BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**. 140. 54–60. 2006.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Vol. 101(1): 117-118. 2006

DAYAKAR, A. et al. Cytokines: key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. **Frontiers in immunology**. Vol. 10. No. 670. 2019.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. 305–318. 2004.

DIAS, E. S. et al. Detection of *Leishmania infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis, in *Lutzomyia neivai*, a putative vector of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Vector Ecology**. Vol. 38, no. 1. 2013.

DIAS, R. C. F. et al. Autochthonous canine visceral leishmaniasis cases occur in Paraná state since 2012: isolation and identification of *Leishmania infantum*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 29(1): e009819. 2020.

DOWNING, T. et al. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. **Genome Research**. 21. 2143–2156. 2011.

DUTHIE, M. S. LISON, A. COURTENAY, O. Advances toward diagnostic tools for managing zoonotic visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**. 34(10): 881–890. 2018.

DYE, C. VIDOR, E. DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiology and Infection**. 103. 647-65. 1993.

ENGVALL, E. PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, elisa. III Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. **The Journal of Immunology**. 109, 129–135. 1972.

ESCOBAR, T. A. et al. Molecular detection of *Leishmania* spp. in Brazilian cross-border south region mammalian hosts. **Transboundary and Emerging Disease**. 00:1–5. 2019.

ESCOBAR, T.A. et al. Risk factors associated to canine visceral leishmaniasis in Uruguaiana city, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 1, p. 211-220, jan./fev. 2018.

EVANS, K. J; KEDZIERSKI, L. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. **Journal of Tropical Medicine**. 2012.

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

FECAM – Federação Catarinense de Municípios. **População Total por ano (censos, contagem e estimativas anuais)**, 2019. Disponível em: <<https://www.fecam.org.br>> Acesso em: 08/05/2019.

FIGUEIREDO, A. B. F. et al. Land use, land cover, and prevalence of canine visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí State, Brazil: an approach using orbital remote sensing. **Cadernos de Saúde Pública**. 33(10). 2017.

FIGUEIREDO, F. B. et al. Relato de caso autóctone de leishmaniose visceral canina na zona sul do município do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 43(1):98-99. 2010.

FIGUEIREDO, F. B. et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 113(11). 2018.

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

FONTELLES, M.J. et al. **Metodologia da pesquisa: diretrizes para o cálculo do tamanho da amostra**. Revista Paraense de Medicina, [s.i.], v. 24, n. 2, p.57-64, 2010.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. [s.i]: Ícone. 607 p. 2004.

FRAGA, D. B. M; et al. The Rapid Test based on *Leishmania infantum* chimeric rK28 protein improves the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by reducing the detection of false-positive dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 10(1). 2016.

FRAGA, J. et al. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**. 10. 238–245. 2010.

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

FREITAS, J. C. C. de; LIMA, A. L; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Spleen damage in a dog naturally infected by *Leishmania infantum*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. [s.l.], v. 50, n. 2, p.280-281. 2017.

FUJIMORI, M. et al. Validation of ELISA with recombinant antigens in serological diagnosis of canine *Leishmania infantum* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. Vol. 116. 2021.

FURTADO, M. C. et al. Comparative study of in situ hybridization, immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**. 8:620. 2015.

GALVIS-OVALLOS, F. et al. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**. 24, 2. 2017.

GENARO, O. **Leishmaniose tegumentar**. In: NEVES, D.P. Parasitologia humana. 8 ed. São Paulo: Atheneu, Cap.7. p.34-72. 1995.

GHORBANIE, M. FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? **Drug Design, Development and Therapy**. 12. 25–40. 2018.

GOMES, A. C. GALATI, E. A. B. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 7 - Capacidade vetorial flebotomínea em ambiente florestal primário do sistema da Serra do Mar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. 23(2):136-42.1989.

GOMES, Y. M. et al. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The Veterinary Journal**. 175. 45–52. 2008.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. ed.7 n.3. pag. 338-49. 2004.

GOUVEIA, C. et al. Integrated tools for American Cutaneous Leishmaniasis surveillance and control: Intervention in an endemic area in Rio de Janeiro, RJ, Brazil. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**. 9 pages. 2012.

GRADONI, L. Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. **Veterinary Parasitology**. 208, 94. 2015.

GREINER, M. GARDNER, I. A. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine**. 45: 3-22. 2000.

GRIMALDI, G. JR. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis

of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54-59. 2012.

GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Infectious Diseases**. Vol 2. 2002.

GUIMARÃES, V. C. F. V. et al. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasites & Vectors**. 9:159. 2016.

HAKKOUR, M. et al. Risk factors associated with Leishmaniasis in the most affected provinces by *Leishmania infantum* in Morocco. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**. 2020.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**. 73(6):897–908. 2015.

HERWALDT, B. L. “Leishmaniasis,” **The Lancet**. Vol 354. 1191-1199. 1999.

IDRISSI, H. et al. Canine Leishmaniasis in Morocco: A Descriptive Prospective Clinical Study. **Veterinary Medicine International**. 2021.

IKONOMOPOULOS, J. et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**. 113. 99–113. 2003.

JULIÃO, F. S. et al. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 27(8):319-324. 2007.

KAMHAWI, S. et al. Protection Against Cutaneous Leishmaniasis Resulting from Bites of Uninfected Sand Flies. **SCIENCE**. Vol. 290. 2000.

KENNER JR, A.N.E. et al. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. **Journal Cutaneous Pathology**. 26(3):130-6. 1999.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. **Medical and Veterinary Entomology**. 4, 1-24. 1990.

KOUTINAS, A. F. KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary Pathology**. Vol. 51(2) 527-538. 2014.

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

KUHLS, K. K. et al. Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS One Neglected Tropical Diseases**., v.5, n.6, 2011.

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

LAINSON, R. SHAW, J. J. LINS, Z. C. Leishmaniasis in Brazil: iv. The fox, *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. Vol. 63. No. 6. pp. 741-745, 1969.

LARA-SILVA, F. O. et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**. Vol.148. 2015.

LARSON, M. et al. Semi-quantitative measurement of asymptomatic *L. infantum* infection and symptomatic visceral leishmaniasis in dogs using Dual-Path Platform® CVL. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 101(1): 381–390. 2017.

LAURENTI, M. D. et al. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. 205. 444–450. 2014.

LEDO, G. Levantamento e distribuição da fauna de flebotomíneos, com uso de armadilha luminosa do tipo CDC, em áreas urbana e periurbana de Lages, Santa Catarina, Brasil. Dissertação. Ciência Animal. UDESC. 38 folhas. 2021.

LEOTE, D. S. The first case of canine visceral leishmaniasis in the southern region of Santa Catarina, an emerging focus of visceral leishmaniasis in Brazil: regional report or reflection of the reality of a country? **Research, Society and Development**, v. 10, n. 17, e167101724326, 2021.

LÉVÊQUE, M. F. et al. Place of serology in the diagnosis of zoonotic leishmaniasis with a focus on visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 10: 67. 2020.

LEVINE, N. D. et al. A newly revised classification of the protozoa. **The Journal of Protozoology**. 27 (1) p. 37-58. 1980.

LIMA, I. S. et al. Assessment of histological liver alterations in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Parasites & Vectors**. 12:487. 2019.

LIMA, I. S. et al. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white Pulp. **PLoS ONE** 9(2): e87742. 2014.

LIMA, W. G. et al. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**. 92. 43–53. 2004.

LINDOSO, J. A. et al. Visceral Leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 8 (9): e3136. 2014.

LIRA R.A., et al. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-BioManguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**. 137(1-2):11-16. 2006.

LOISEAU, P. M. POMEL, S. CROFT, S. L. Chitosan contribution to therapeutic and vaccinal approaches for the control of leishmaniasis. **Molecules**. 25, 4123. 2020.

LUZ, Z. M. P. et al. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 34 (3): 249-254. 2001.

MADEIRA, I. M.V. M. et al. Immunohistochemical study of hepatic fibropoiesis associated with canine visceral leishmaniasis. **International Journal Experimental Pathology**. 97, 139–149. 2016.

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

MAGALHÃES, A. O. et al. Anatomopathological and immunohistochemical analyses of the spleen and lymph node of dogs seropositives for leishmaniasis in serological tests. **Ciência Animal Brasileira**. V 22. e-68909. 2021.

MAIA C, CAMPINO L. Biomarkers Associated With *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs. **Front Cell Infect Microbiol**. Sep 6; 8:302. 2018.

MAIA, C. CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**. 158. 274–287. 2008.

MANCIANTI, F, et al. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 82(4): 566-567.1988.

MANNA L., et al. Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. **Parasites & Vectors**. 2015.

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

MARCILI, A. et al. Canine visceral leishmaniasis in São Paulo, Brazil, the most populous city of South America: Isolation, molecular diagnosis, and phylogenetic inferences. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. Volume 20, Number 10. 2020.

MARCONDES, C. B. LOZOVEI, A. L. VILELA, J. H. Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 31(1):51-58. 1998.

MARINHO, R. M. et al. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em reservas florestais da área metropolitana de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia** 52(1): 112-116. 2008.

MARQUES, N. C. et al. Immunodetection of hepatic stellate cells in dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, [s.l.], v. 117, n. 6, p.1829-1837, 27. 2018.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 80, 859-876. 1986.

MARTY, P. ROSENTHAL, E. Treatment of visceral leishmaniasis: a review of current treatment practices. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. 3(8). 2002.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. 1(4). 432-446. 1985.

MARZOCHI, M.C.A. et al. Leishmaniose Visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**. [s.i.], v. 41, n. 5, p.69-84, 1981.

MATSUMOTO, P. S. S. GUIMARÃES, R. B. Use of Geographic Information Systems in health: spatial analysis in canine visceral leishmaniasis in Presidente Prudente – SP, Brazil. **Research Gate**. 2014.

MATSUMOTO, P.S.S. CASAGRANDE, B. GUIMARÃES, R. B. **Evolução de casos humanos de leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo: 1999 a 2011**. VI Simpósio Nacional de Geografia da Saúde III Fórum Internacional de geografia da Saúde. 2013.

MAURÍCIO, I. L. STOTHARD, J. R. MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, vol. 16, no. 5, 2000.

MAZIERO, N.; et al. Rural–urban focus of canine visceral leishmaniosis in the far western region of Santa Catarina State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. 205. 92–95. 2014.

MAYER, P. Notiz über Hämatëin und Häkalaun. **Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik**. n. 20, p. 409, 1903.

MENDONÇA, I. L. et al. The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 59:e39. 2017.

MENEZES, J. A. et al. An Integrated Approach Using Spatial Analysis to Study the Risk Factors for Leishmaniasis in Area of Recent Transmission. **BioMed Research International**. 2015.

MENEZES, R. C. et al. Cell-block Immunohistochemistry of Bone Marrow Aspirates: a Novel Tool to Improve the Diagnosis of Leishmania Infection in Dogs. **Journal of Comparative Pathology**. 1 - 4. 2016.

MESTRE, G.; L.C.; FONTES J. The spread of the visceral leishmaniasis epidemic in the State of Mato Grosso, 1998-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. ed. 40 n 1: 42-48. 2007.

METTLER, M. GRIMM, F. CAPELLI, G. CAMP, H. DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**. 43: 5515-5519. 2005.

MIRANDA, S. et al. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. **Research in Veterinary Science**. 85. 35–38. 2008.

MIRÓ, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonoses: part two. **Trends in Parasitology**. Vol.24 No.8. 2008.

MIRÓ, G. et al. Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. **Parasites & Vectors**. 6:117. 2013.

MISSAWA, N. A. et al. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Cuiabá MS, v. 1, n. 44, p.76-78, 2011.

MONTEIRO, E. M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 38(2):147-152. 2005.

MONTEIRO, S. G et al. Detecção de *Leishmania infantum* em cão no município de Uruguaiana, RS: Uma contribuição para a discussão das leishmanioses na região Sul do Brasil. **Veterinária e Zootecnia**. 17(4): 497- 501. 2010.

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

MORENO, J. ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **TRENDS in Parasitology**. Vol.18 No.9. 2002.

MORENO, J. et al. Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 6(6): e1683. 2012.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. **The journal of Immunology**. Vol. 136. No. 7. 1986.

MOYA, S. L. et al. First description of *Migonemyia migonei* (Franc, a) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Psychodidae: Phlebotominae) natural infected by *Leishmania infantum* in Argentina. **Acta Tropica**. 152. 181–184. 2015.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**. 366: 1561–77. 2005.

NAVEDA, L. A. B. et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, n.6, p.988-993, 2006.

NICOLE, C. H. Culture du parasite du Bouton d'Orient. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**. 146: 842. 1908.

NOVY, F. G. McNEAL, W. J. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Infectious Diseases**. 1:1–30. 1904.

OKWOR, I. UZZONA, J. Social and economic burden of human leishmaniasis. **American Journal Tropical of Medicine and Hygiene**. 94(3). pp. 489–493. 2016.

OLIVEIRA, G. M. G. et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de leishmaniose visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. 1(3):83-94. 2010.

OLIVEIRA, V. C. 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**. 12(4): e0175588. 2017.

OPAS 2009. **Encuentro sobre Vigilancia, Prevención y Control de Leishmaniasis visceral (LV) en el Cono Sur de Sudamérica, Foz do Iguazú, Brasil**. Organización Panamericana de Saúde. Disponível em <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=270&gid=16961&lang=em>. Acesso em: 20/06/2021.

OPS/OMS - ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Americas**. Washington, D.C.: OPS; 2019.

ORDEIX, L.; et al. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune response. **Veterinary Dermatology**. v. 16, p. 187-191, 2005.

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

PACHECO-FERNANDEZ, T. et al. Revival of leishmanization and leishmanin. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 11:639801. 2021.

PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Vol 236, No. 11. 2010.

PALTRINIERI, S. et al. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**. 1-27. 2016.

PANDOLFO, C. et al. **Atlas climatológico digital do Estado de Santa Catarina**. Epagri, 2002. CD-Rom.

PAPARCONE, R. et al. Sternal aspiration of bone marrow in dogs: A practical approach for canine leishmaniasis diagnosis and monitoring. **Journal of Veterinary Medicine**. 4.p. 2013.

PARKER, L. A. et al. A novel sampling model to study the epidemiology of canine leishmaniasis in an urban environment. **Frontiers in Veterinary Science**. 8:642287. 2021.

PASQUALI, A. K. S. et al. Dispersion of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in central-southern Brazil: Evidence from an integrative approach. **PLoS Neglected Tropical Disease** 13 (8): e0007639. 2019.

PATTABHI, S. et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. V. 4.9. 2010.

PATZ, J. A. Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. **Environmental Health Perspectives**. Vol. 112. 10. 2004.

PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**. 39(7): 839–847. 2007.

PEARSON, R. D. SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**. 22:1-13. 1996.

PECH-MAY A. et al. Genetic diversity, phylogeography and molecular clock of the *Lutzomyia longipalpis* complex (Diptera: Psychodidae). **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2018.

PEREGO, R. Prevalence of Dermatological Presentations of Canine Leishmaniasis in a Nonendemic Area: A Retrospective Study of 100 Dogs. **Veterinary Medicine International**. 2014.

PICÓN, Y. et al. Seroprevalence, clinical, and pathological characteristics of canine leishmaniasis in a central region of Colombia. **Journal Veterinary Research**. 64, 85-94, 2020.

PINTO, A. J. W. et al. Glycol methacrylate embedding for the histochemical study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **European Journal of Histochemistry**. Vol. 59:2546. 2015.

PINTO, A. O. et al. First case of canine visceral leishmaniasis in the midwestern of Santa Catarina State, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. vol. 82, e241162. 2022.

PITA-PEREIRA, D. et al. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**. 107. 66–69. 2008.

POCAI, E. A. et al. Leishmaniose visceral (Calazar): cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. v. 28, n 3, p 501-505. 1998.

PORROZZI, R. et al. Comparative evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays based on crude and recombinant Leishmanial antigens for serodiagnosis

of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and Vaccine Immunology**. 544–548. 2007.

POTTER, R.O. et al. **Solos do estado de Santa Catarina**. Embrapa Solos. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 46. Embrapa Solos, Rio de Janeiro. 721p. 2004.

PRESTES-CARNEIRO, L. E. et al. Spatiotemporal analysis and environmental risk factors of visceral leishmaniasis in an urban setting in São Paulo State, Brazil. **Parasites Vectors**. 12:251. 2019.

QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. V. 19, n. 1, p. 32-38. 2010.

QUINNELL, R. J. et al. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**. 122, 253–26. 2001.

RAMÍREZ, L. et al. Improving the serodiagnosis of canine *Leishmania infantum* infection in geographical areas of Brazil with different disease prevalence. **Parasite Epidemiology and Control**. (8). 2020.

REAL, F. The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Functional annotation and extended analysis of gene models. **DNA Research**. 20, 567–581. 2013.

REBÊLO, J. M. M. et al. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em focos de leishmanioses, em área de ecoturismo do entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. 26(1):195-198. 2010.

REGINA-SILVA, S. et al. Evaluation of parasitological examination, kDNA polymerase chain reaction and rK39-based immunochromatography for the diagnosis of visceral leishmaniasis in seropositive dogs from the screening-culling program in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 47:462-8. 2014.

- RÊGO, F. D et al. Ecology and molecular detection of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (Kinetoplastida: Trypanosomatida) in wild-caught sand flies (Psychodidae: Phlebotominae) collected in Porto Alegre, Rio Grande do Sul: A new focus of visceral leishmaniasis in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 56 (2). 519–525. 2019.
- REIMÃO, J. Q. et al. Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. **Microorganisms**, 8, 1632. 2020.
- REIS, L. E. S. 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. **Veterinary Parasitology** 197. 498–503. 2013.
- RIBEIRO JM. Vector salivation and parasite transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 82:1-3. 1987.
- RIBEIRO, R. R. et al. Canine Leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control. **BioMed Research International**. 2018.
- RIBOLDI, E. et al. Molecular Method Confirms Canine *Leishmania* Infection Detected by Serological Methods in Non-Endemic Area of Brazil. **The Korean Journal of Parasitology**. Vol. 56, No. 1: 11-19. 2018.
- RIERA, C., et al. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. **Veterinary Parasitology**. 84 (1–2), 33–47. 1999.
- RIOUX, J. A. et al. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes suggestions for a new classification. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** 65, n° 3, 111-125. 1990.
- ROCHA, M. F. et al. Dogs with divergent serology for visceral leishmaniasis as sources of *Leishmania* infection for *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies – an observational study in an endemic area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 14(2): e0008079. 2020.
- ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**. 2 (2237): 1261-1262. 1903.

RUTLEDGE, L. C. ELLENWOOD, D. A. Production of phlebotomine sandflies on the open forest floor in Panama: The species complement. **Environmental entomology**. Vol. 4, no. 1. 1975.

SALOMÓN, O. D. et al. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. **Acta Tropica**. 113. 84–87. 2010.

SANTA CATARINA. Dive/SC orienta sobre medidas da leishmaniose visceral. 2017. Disponível em: <https://www.saude.sc.gov.br/index.php/noticias-geral/todas-as-noticias/1628-noticias-2017/5813-divesc-orienta-sobre-medidas-da-leishmaniose-visceral>. Acesso em: 24/05/2021.

SANTANA, C. C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**. 30, 515–524. 2008.

SANTARÉM, N. et al. Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**. 1866–1874. 2010.

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

SANTOS, G. P. L. et al. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 38(2):161-166. 2005.

SANTOS-GOMES, G. M. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 88. 21–30. 2002.

SARAIVA L. et al. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**. 46 (5): 1159 – 1163. 2009.

SCALONE, A. et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology** 104. 275–285. 2002.

SCHLEIN, Y. *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitology Today**, 9: 255-257, 1993.

SCHUBACH, E. Y. P. FIGUEIREDO, F. B. ROMERO, G. A. S. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 108: 568–574. 2014.

SCHUSTER, F. L. SULLIVAN, J. J. Cultivation of Clinically Significant Hemoflagellates. **Clinical Microbiology Reviews**. 374–389. 2002.

SCORZA, B. M. CARVALHO, E. M. WILSON, M. E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International Journal Molecular Science**. 18. 1296. 2017.

SEGATTO, M. et al. Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Vol. 107(1): 39-47. 2012.

SENGUPTA, P.C. History of kala-azar in India. **Indian Medical Gazette**. 82:281–286. 1947.

SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO (SFB). **Inventário Florestal Nacional: principais resultados: Santa Catarina**. Brasília, DF: MMA. 106 p. (Série Relatórios Técnicos – IFN). 2018. Disponível em: <http://www.florestal.gov.br/publicacoes>. Acesso em: 27/08/2021.

SEVÁ, A. P. et al. Canine-based strategies for prevention and control of visceral leishmaniasis in Brazil. **PLoS ONE** 11(7): e0160058. 2016.

SEVÁ, A. P. et al. Investigation of canine visceral leishmaniasis in a non-endemic area in Brazil and the comparison of serological and molecular diagnostic tests. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**. Vol.:54. 2021.

- SEVÁ, A. P. et al. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 11(2). 2017.
- SHER, A. COFFMAN, R. L. Regulation of immunity to parasites by t cells and T cell-derived cytokines. **Annual Review Immunology**. 10:385-409. 1992.
- SHOKRI, A. FAKHAR, M. TESHNIZI, S. H. Canine visceral leishmaniasis in Iran: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica** 165. 76–89. 2017.
- SILVA F.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Tropical Ciências Agrárias e Biológicas**. ed. 1 n1. pag 20-31. 2007.
- SILVA, A. V. et al. Leishmaniasis in domestic dogs: 18 epidemiological aspects. **Cadernos de Saúde Pública**. 21(1): 324-328. 2005.
- SILVA, D. A. MADEIRA, M. F. FIGUEIREDO, F. B. Geographical expansion of canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 57(5):435-438. 2015.
- SILVA, D. T. et al. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**. Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 179-186. 2014.
- SILVA, T.A.M; et al. Spatial and temporal trends of visceral leishmaniasis by mesoregion in a southeastern state of Brazil, 2002-2013. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 11, n. 10, p.1-20. 2017.
- SILVEIRA, F. T. CORBETT, C. E. P. *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: nativa ou introduzida? Uma breve revisão. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. 1(2):143-147. 2010.
- SINGH B.; SUNDAR S. Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**. 30, 3834. 2012.
- SINGH, S. DEY, A. SIVAKUMAR, R. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. **Expert Review of Molecular Diagnostics**. 5(2), 251-265. 2005.

SLAPPENDEL, R. J. TESKE, E. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (glucantime®) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. **The Veterinary Quarterly**, vol 19, no 1. 1997.

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

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Longitudinal study of dogs living in an area of Spain highly endemic for leishmaniasis by serologic analysis and the leishmanin skin test. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 72(6). pp. 815–818. 2005.

SOLCÀ, M. S. et al. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **PLoS ONE**. V.9. (7): e103635. 2014.

SOUSA-PAULA, L. C. OTRANTO, D. DANTAS-TORRES, F. *Lutzomyia longipalpis* (Sand Fly). **Trends in Parasitology. Vector of the month**. 2020.

SOUZA, A. A.A. et al. Fauna flebotomínica da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil, e sua possível implicação na transmissão da leishmaniose tegumentar americana. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. 1(1):45-51. 2010.

SOUZA, G. D. SANTOS, E. FILHO, J. D. A. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Vol. 104(8): 1181-1182. 2009.

SOUZA, M. B. et al. Ausência da *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no Município do Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**. 19(6):1881-1885. 2003.

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

STRAZZULA, A. et al. Mucosal Leishmaniasis: An Underestimated Presentation of a Neglected Disease. **BioMed Research International**. 7. 2013.

SUNDAR, S. RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. p. 951–958. 2002.

SUNDAR, S. SINGH, O. P. Molecular diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Molecular Diagnosis and Therapy**. 22(4): 443–457. 2018.

SUNYOTO, T. POTET, J. BOELAERT, M. Why miltefosine—a life-saving drug for leishmaniasis—is unavailable to people who need it the most. **BMJ Glob Health**. 3:e000709. 2018.

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**. 292. 17 – 23. 2004.

TAFURI, W. L. et al. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**. 96. 203–212. 2001.

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

TEIXEIRA, D. G. et al. Comparative analyses of whole genome sequences of *Leishmania infantum* isolates from humans and dogs in northeastern Brazil. **International Journal Parasitology**. 47(10-11): 655–665. 2017.

TEIXEIRA, A. I. P. et al. Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, Vol. 114: e180452. 2019.

TEIXEIRA, A. I. P. SILVA, D. M. ROMERO, G. A. S. Spatial analysis of the occurrence of canine visceral leishmaniasis cases using different parameters for infection case definition. **Journal of Veterinary Science and Public Health**, v. 8, n. 2, p. 096-103, 2021.

TEODORO, U. et al. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**. 27(4), 1993.

TEODORO, U. et al. Reorganization and Cleanness of Peridomiciliar Area to Control Sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in South Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Vol.47, n. 2: pp. 205-212, June 2004.

THAKUR, S. JOSHI, J. KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **Journal of Parasitics Disease**. 44(2):253–272. 2020.

TRIPATHI, P. SINGH, V. NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **Immunology and Medical Microbiology**. 51. 229–242. 2007.

THOMAZ SOCCOL, V. et al. More than the eyes can see: The worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. **PLoS Neglected Tropical Disease** 12 (12): e0189182. 2017.

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

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Hidden danger: Unexpected scenario in the vector-parasite dynamics of leishmaniasis in the Brazil side of triple border (Argentina, Brazil and Paraguay). **PloS Neglected Tropical Disease** 12 (4): e0006336. 2018.

TOPLU, N. AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. **Parasitology Research**. 109:1051–1057. 2011.

TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 64 (3, 4). 119–124. 2001.

- TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 12 (1). 2018.
- TRYPHONAS, L. et al. Visceral Leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. **Canadian Journal Comparative Medicine**. Vol. 41. 1977.
- UCHÔA, C. M. A. et al. Aspectos sorológicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana canina em Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 34 (6): 563-568. 2001.
- VARIZA, P. F. et al. Notes on the sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in a region of Brazil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, e596101422480, 2021.
- VENTURIN, G. L. et al. Recombinant K28 antigen in ELISA in the diagnosis of canine visceral leishmaniosis. **Parasite Immunology**. 37, 670–673. 2015.
- VERÇOSA, B. L. A. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**. 4:45. 2008.
- VIGODER, F.M.; et al. Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. **Infection, Genetics and Evolution**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.734-739, ago. 2010.
- VOLPEDO, G. et al. Determinants of innate immunity in visceral leishmaniasis and their implication in vaccine development. **Frontiers in Immunology**. 12:748325. 2021.
- WERNECK, G. L. et al. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, **Brazil**. **Epidemiol. Infect.** 135, 195–201. 2007.
- WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. 2021.
- WHO. World Health Organization. **The world health report**. Geneva. 1990.

WILSON, T. M. et al. Renal lesions in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Bioscience Journal**. v. 33, n. 4, p.990-995, jul. 2017.

WINCKER, P. et al. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**. 24:1688–94. 1996.

XAVIER, S. C. et al. Comparison of paraffin – embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, v. 2, n. 17, p. 1-7, 2006.

XIMENES, M. F. F. M. et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e Leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil - Reflexos do Ambiente Antrópico. **Neotropical Entomology** 36(1): 128-137. 2007.

ZANETTE, M. F. et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 47:105-107. 2013.

ZUCHI, T. L. V. L. et al. Levantamento entomológico de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na cidade de Concórdia, oeste de Santa Catarina, Brasil. **Anais da Mostra de Iniciação Científica do IFC Campus Concórdia**, v. 12 n.1 (2022).

ANEXO I

ESPECIFICAÇÕES DO FABRICANTE – TESTE DPP (BIO-MANGUINHOS)



**TR DPP® LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA**
Bio-Manguinhos
(USO VETERINÁRIO)

TESTE RÁPIDO QUALITATIVO PARA A DETECÇÃO DE
ANTICORPOS DE CÃO PARA *LEISHMANIA* EM SORO, PLASMA
OU SANGUE TOTAL VENOSO
(material fornecido para 20 reações)

 Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

 Instituto de Tecnologia
em Imunobiologia
Bio-Manguinhos

TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Bio-Manguinhos
(USO VETERINÁRIO)

TESTE RÁPIDO QUALITATIVO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS DE CÃO PARA *Leishmania*
(material fornecido para 20 reações)

INDICAÇÃO DE USO

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é um teste de triagem imunocromatográfico de uso único para detecção, em cães, de anticorpos específicos para *Leishmania*, em soro, plasma ou sangue total venoso.

O teste é usado para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina em associação a outros critérios. O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é indicado para uso por profissionais de saúde de acordo com as instruções fornecidas.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS

A leishmaniose é causada por um protozoário parasita do gênero *Leishmania*. Essa doença é endêmica em 88 países, totalizando 350 milhões de pessoas. A *Leishmania* está presente em áreas desde a floresta tropical das Américas do Sul e Central aos desertos no Oeste da Ásia, com mais de 90 % de todos os casos de leishmaniose visceral (LV) ocorridos em Bangladesh, Nepal, Índia, Sudão e Brasil. Há cerca de 500.000 novos casos anuais de leishmaniose visceral humana^{1,2}. Entre os anos de 1984 a 1999, 37.294 novos casos de LV humana foram relatados pelo Ministério da Saúde³.

A LV, algumas vezes referida como Kalazar é uma doença crônica e potencialmente letal se não tratada antes do aparecimento de sintomas. Sinais clínicos da doença incluem indisposição, anemia, febre, perda de peso e inchaço no baço, fígado e gânglios linfáticos¹.

A infecção pode ser prevenida evitando-se a picada de flebotômios através de protetores como vestuário, repelentes ou inseticidas. Tratamentos para LV são muito difíceis e geralmente requerem o uso de antimônio pentavalente ou estibogluconato de sódio¹.

A LV é uma zoonose na qual os canídeos têm sido implicados como importantes reservatórios para o parasita^{4,5}. A transmissão aos humanos ocorre pela picada do flebotomo fêmea infectado. Programas de controles para LV incluem a eutanásia de cães infectados identificados através de teste sorológico. Este procedimento tem provado ser uma importante etapa do controle empregado no Brasil⁶.

Vários ensaios como a imunofluorescência, hemaglutinação, PCR e ELISA encontram-se atualmente em uso para este diagnóstico^{5,6,7} e os antígenos recombinantes são ferramentas apropriadas para melhorar os métodos de diagnóstico sorológico atuais para leishmaniose visceral canina (LVC).

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é um ensaio de triagem, imunocromatográfico, que emprega uma combinação única de antígenos recombinantes específicos para a detecção de anticorpos específicos para *Leishmania*, em cães. É rápido, simples e fácil de usar e pode ser armazenado à temperatura ambiente (2 °C a 30 °C).

PRINCÍPIO DO TESTE

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos emprega uma combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal e anticorpos específicos da amostra para *Leishmania*. Em sequência, reage com antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi* ligados a uma membrana (fase sólida).

A amostra é aplicada ao poço #1 (AMOSTRA + TAMPÃO), seguida pela adição do tampão de corrida. O tampão propicia o fluxo lateral promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos. Após a migração da amostra e do tampão ao longo do suporte de teste, deve-se adicionar tampão de corrida ao poço # 2 (TAMPÃO). O conjugado se liga aos anticorpos específicos para *Leishmania* produzindo uma linha (roxa/rosa) na área do TESTE (T). Na ausência de anticorpos para *Leishmania* a linha (roxa/rosa) não aparece na área do TESTE (T). Em ambos os casos, a amostra continua a migrar ao longo da membrana produzindo uma linha (roxa/rosa) na área de CONTROLE (C), o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes.

MATERIAL FORNECIDO

Suportes DPP® contendo Proteínas Recombinantes K28 de <i>Leishmania Chagasi</i> e a Proteína A Conjugada ao Ouro Coloidal, adsorvidos em Membranas de Nitrocelulose.	20 suportes
Tampão de Corrida	01 frasco (6 mL)
Alças Coletoras Descartáveis (5 µL)	20 alças
Lancetas Descartáveis	20 lancetas
Manual de Instrução de Uso	01 unidade

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO

- Cronômetro ou relógio
- Micropipetador calibrado para 5 µL (como alternativa à alça coletora)
- Luvas descartáveis
- Recipiente seguro para descarte de material biológico
- Álcool 70 %

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos deve ser armazenado entre 2 °C e 30 °C. Recomenda-se a conservação do kit em geladeira somente em locais onde a temperatura ambiente ultrapasse 30 °C. Não congele o kit ou os seus componentes. Os suportes de teste devem permanecer lacrados até o momento de sua utilização. O tampão de corrida deve ser mantido em seu recipiente original. Caso o kit seja guardado sob refrigeração assegurar-se de que todos os componentes estejam à temperatura ambiente no momento de sua utilização.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Somente para uso em diagnóstico *in vitro*.

Somente para uso veterinário.

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos podendo representar uma fonte de risco. Ao manusear este conjunto, observe as precauções de biossegurança necessárias.

A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento das Boas Práticas de Laboratório, tais como:

- O teste deve ser realizado apenas por profissionais de saúde segundo as instruções contidas neste manual;
- Não realizar mais de 5 testes por vez. Esta conduta reduz falhas no procedimento do teste, bem como na interpretação dos resultados;
- As amostras devem ser homogeneizadas antes do uso;
- As amostras de sangue não testadas imediatamente após a coleta devem ser refrigeradas entre 2 °C e 8 °C, podendo ser usadas em até 3 dias;
- Amostras de soro ou plasma podem ser conservadas entre 2 °C e 8 °C por 3 dias após a coleta, até que sejam utilizadas no teste. Caso a realização do teste não seja possível dentro deste período, as amostras devem ser congeladas (-20 °C ou abaixo);
- Equipamentos de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis, óculos e Jaleco, devem ser utilizados em todas as etapas de realização do teste;
- Os testes nunca devem ser utilizados após a data de validade;
- Componentes de kits de lotes diferentes nunca devem ser misturados;
- A integridade dos componentes do kit sempre deve ser verificada. Em especial, assegurar-se de que a embalagem dos suportes esteja intacta. Caso algum dos componentes do kit demonstre irregularidade, separe o kit evitando que seja utilizado e entre em contato com o SAC de Bio-Manguinhos;
- Nunca fracionar os kits.
- Não pingar sangue diretamente no suporte de teste. Utilizar sempre a alça coletora fornecida no kit, segundo as orientações abaixo (ver Procedimento do Teste);
- Cuidado ao adicionar a amostra: a alça deve ser mantida em posição vertical e a amostra deve ser aplicada ao centro do orifício ou poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO) do suporte de teste;
- Cuidado ao adicionar o tampão de corrida: o frasco deve ser mantido em posição vertical e apenas duas gotas do líquido devem ser dispensadas ao poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO) do suporte de teste onde se encontra a amostra;
- Aguardar cinco minutos e somente após o desaparecimento das cores das linhas T (TESTE) e C (CONTROLE) adicionar quatro gotas do tampão de corrida ao poço # 2 (TAMPÃO);

ATENÇÃO: Alguns resultados reagentes podem aparecer em menos de 10 minutos, mas são necessários 10 minutos para detectar um resultado não-reagente. Ler os resultados em ambiente bem iluminado. Não ler os resultados após 25 minutos da adição do tampão de corrida ao poço # 2 (TAMPÃO).

- Após o uso, suportes, ponteiros, lancetas, alças coletoras e luvas devem ser descartadas em água sanitária ou em solução de hipoclorito de sódio a 2,5 % como material biológico potencialmente infeccioso.

COLETA DE AMOSTRA

ATENÇÃO: para o perfeito funcionamento do teste, usar 5 µL de amostra e seguir as instruções de procedimento do teste.

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos pode ser realizado com amostra de soro, plasma ou sangue total venoso.

Sangue total

Utilizar a lanceta para obter sangue a partir da orelha, patas ou rabo do animal. Para teste imediato utilizar as alças coletoras.

Sangue Total Venoso

Coletar o sangue assepticamente nos tubos contendo EDTA, heparina ou citrato de sódio. Certifique-se que o tubo de sangue foi bem misturado antes da amostragem. Siga corretamente o procedimento do teste.

Soro

Obtido do sangue total coletado assepticamente por punção de veia com um tubo limpo sem anticoagulante. Deixar o sangue coagular a temperatura ambiente. Centrifugar o sangue a 2000 rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Separar o soro do coágulo para evitar hemólise.

Plasma

Coletar o sangue total com anticoagulante, centrifugar a 2000 rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente e separar o plasma sobrenadante.

PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DO TESTE RÁPIDO TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - BIO-MANGUINHOS

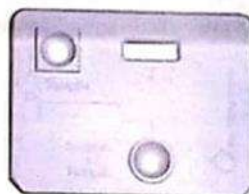
1. Certifique-se que a amostra a ser testada esteja à temperatura ambiente. Caso esteja refrigerada ou congelada, permitir que a mesma alcance a temperatura ambiente antes de ser testada.

2. Retirar o número necessário de componentes do TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA BIO-MANGUINHOS e colocá-los sobre uma superfície plana. Caso o kit tenha sido guardado sob refrigeração, certifique-se de que os componentes do kit estejam a temperatura ambiente no momento do uso.



3. Retirar o suporte de teste do envelope laminado e identificá-lo com o nome do animal ou número de identificação, além do número do lote do kit de onde o suporte foi retirado.

4. Verificar a integridade de todos os componentes e a existência de 2 (duas) linhas na janela de teste do suporte, sendo 1 (uma) de cor azul e 1 (uma) de cor verde. Caso uma ou mais dessas linhas esteja ausente, separar o suporte de teste para que não seja usado e comunicar o ocorrido ao SAC de Bio-Manguinhos. Em seguida, utilizar um novo suporte de teste para continuar o procedimento.



5. Encostar a alça coletora de 5 µL na amostra a ser testada, permitindo que a alça seja preenchida com a amostra. Alternativamente, podem-se utilizar micropipetas automáticas, calibradas e ajustadas para 5 µL.



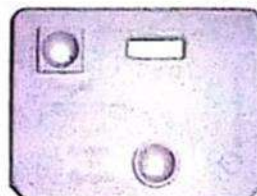
6. Segurar a alça coletora na posição vertical e tocar na área de aplicação da amostra, poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO) do suporte para liberar 5 µL de amostra. Certifique-se de que a amostra de sangue total, soro ou plasma migrou/escorreu da alça para o local do teste.



7. Virar o frasco de tampão e manter na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO). Adicionar 2 (duas) gotas de tampão, lentamente, ao poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO).



8. Aguardar 5 (cinco) minutos. Após esse tempo, a linha azul (TESTE) e verde (CONTROLE) da janela devem ter desaparecido. Em caso contrário, descartar o suporte de teste e repetir o procedimento desde o início usando um novo suporte.



9. Virar o frasco de tampão e mantê-lo na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço # 2 (TAMPÃO). Adicionar 4 (quatro) gotas de tampão, lentamente, ao poço # 2 (TAMPÃO).



10. Deixar o teste correr por 10 (dez) minutos a temperatura ambiente. Caso não haja migração após 3 (três) minutos, descartar o teste.

11. Leitura do Teste - Não ler os resultados após 25 minutos da adição do tampão de corrida ao poço # 2 (TAMPÃO).

Leitura Visual

Colocar o suporte sobre uma superfície plana e em local bem iluminado. O operador deve se posicionar de forma a manter uma distância de 30 a 50 cm entre o suporte de teste e seus olhos. Observar a presença de linhas e anotar no protocolo de testes.

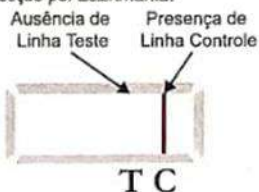
ATENÇÃO: Após a leitura, descartar o suporte, a alça e a lanceta utilizados no teste em um recipiente para descarte de materiais de risco biológico.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados são interpretados visualmente. Em caso de dúvidas na interpretação do teste, separar o suporte e fazer contato com o SAC de Bio-Manguinhos.

Resultado NÃO REAGENTE

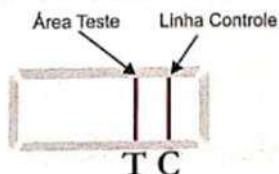
Um resultado não reagente é indicado por uma linha roxa/rosa na área de CONTROLE (C) e nenhuma linha na área de TESTE (T). Este resultado sugere a ausência de anticorpos para *Leishmania* na amostra e não exclui a possibilidade de infecção por *Leishmania*.



Resultado REAGENTE

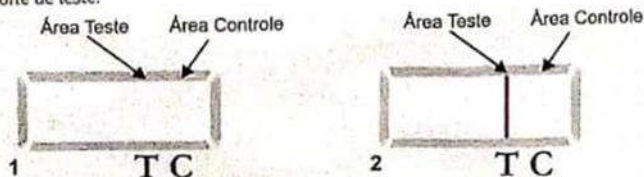
A detecção de duas linhas roxa/rosa, uma na área de CONTROLE (C) e outra na área de TESTE (T), indica um resultado reagente. A intensidade da linha na área de TESTE (T) varia de claro a muito escuro conforme a concentração de anticorpos específicos. Assim, a linha na área de TESTE (T) pode ter aparência diferente da linha na área de CONTROLE (C). Isto não invalida o teste. Um teste reagente significa que anticorpos para *Leishmania* foram detectados.

ATENÇÃO: Um resultado reagente deve ser confirmado conforme recomendações do Ministério da Saúde.



Resultado INVÁLIDO

Uma linha roxa/rosa deve sempre aparecer na área de CONTROLE (C), independente da presença ou não de linha na área de TESTE (T). Caso uma linha roxa/rosa não seja visível na área de CONTROLE (C), o teste deve ser considerado inválido. Um resultado inválido não pode ser interpretado. Separar o material e fazer contato com o SAC de Bio-Manguinhos. Repetir o procedimento de teste com um novo suporte de teste.



CONFIRMAÇÃO DE DESEMPENHO DO TESTE

Ao término do teste, uma linha roxa/rosa aparecerá na área de CONTROLE (C), tanto nas amostras negativas quanto nas positivas. Esta linha serve de controle interno, confirmando o desempenho adequado do teste.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos deve ser utilizado com soro, plasma ou sangue total venoso.

Outros tipos de amostras de sangue coletadas em tubos contendo anti-coagulantes que não citratos, heparina ou EDTA, podem gerar resultados inadequados. Para amostras de soro, coletar sangue sem anticoagulante.

- O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos deve ser utilizado segundo as instruções contidas neste manual visando à obtenção de resultados adequados.

- Proceda a leitura do teste em, no máximo, 25 minutos.

- Somente abra o envelope contendo o suporte de teste no momento de sua utilização.

- Um resultado reagente indica a presença de anticorpos para *Leishmania* na amostra testada.

- Um resultado não reativo não exclui a possibilidade de exposição à *Leishmania* ou infecção por *Leishmania*. Uma resposta humoral a uma exposição recente pode levar alguns meses até atingir níveis detectáveis.

- Um animal infectado com *Leishmania* que esteja recebendo algum tipo de medicamento pode produzir resultado falso negativo.

ÍNDICES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Os índices de sensibilidade e especificidade do TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos foram determinados pela avaliação da capacidade de detectar anticorpos específicos para *Leishmania* em amostras clínicas (sangue, soro e plasma) de cães. Usando como referência o teste parasitológico de 62 cães, o TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos apresentou sensibilidade de 100 % (sangue), 100 % (soro) e entre 92.9 % - 100 % (plasma) e especificidade entre 87.5 % - 91.7 % (sangue), 87.5 % - 91.7 % (soro) e 87.5 % - 89.6 % (plasma).

Quando comparado ao Teste EIE Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos, para 77 amostras de cães, o TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos apresentou uma sensibilidade entre 89.7 % - 96.6 % (sangue), 89.7 % - 93.1 % (soro) e 89.7 % - 100 % (plasma) e uma especificidade entre 97.9 % - 100 % (sangue), 93.8 % - 97.9 % (soro) e 95.8 % - 97.9 % (plasma).

REPRODUTIBILIDADE, REPETITIVIDADE E ESTABILIDADE

As boas práticas de fabricação e laboratoriais, associadas a simplicidade e rapidez na utilização do TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos garantem sua reprodutibilidade, repetitividade e estabilidade, podendo ser utilizado como método seguro e eficaz na detecção de anticorpos específicos para a evidência da infecção por *Leishmania*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. The UNICEF-UNDP-World Bank-WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). www.whl.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm, 2002.
2. CDC. Division of Parasitic Diseases. www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/leishmania/factsht_leishmania.htm, 2004.
3. PALATNIK-DE-SOUSA, C.B., dos Santos, W.R., Franca-Silva, J.C., da Costa, R.T., Reis, A.B., Palatnik, M., Mayrink, W., Genaro, O. Impact of Canine Control of the Epidemiology of Canine and Human Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 65: 510-517, 2001.
4. ASHFORD, D.A., David, J.R., Freire, M., David, R., Sherlock, I., da Conceicao Eulallo, M., Sampaio, D.P., Badaro, R. Studies on Control of Visceral Leishmaniasis: Impact of Dog Control on Canine and Human Visceral Leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 59: 53-57, 1998.
5. REITHINGER, R., Quinell, R.J., Alexander, B., Davies, C.R. Rapid Detection of Leishmania Infantum Infection in Dogs: Comparative Study Using and Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. *J Clin Microbiol*, 40: 2352-2356, 2002.
6. DO ROSARIO, E.Y., Genaro, O., Franca-Silva, J.C., da Costa, R.T., Mayrink, W., Reis, A.B., Carneiro, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude Leishmania and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100: 197-203, 2005.
7. PORROZZI, R., Santos da Costa, M.V., Teva, A., Falqueto, A., Ferreira, A.L., Santos, C.D., Fernandes, A.P., Gazinelli, R.T., Campos-Neto, A., Grimaldi, G. Jr. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania Infantum visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol*, 14: 544-548, 2007.

Licenciado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob o nº 9591/2011.

Resp. Téc. Méd. Vet.: Adenauer Cruz Teixeira | CRMV-RJ nº 1.359

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos | Bio-Manguinhos | FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21040-900 | Rio de Janeiro-RJ | CNPJ 33.781.055/0015-30

SAC: 08000.210.310 | sac.reativos@bio.fiocruz.br | www.bio.fiocruz.br

Indústria Brasileira

ANEXO II

ESPECIFICAÇÕES DO FABRICANTE – TESTE ELISA (BIO-MANGUINHOS)



Bio-Manguinhos

Tel.: (21) 3882.9393
FAX: (21) 2561.0277
SAC: 0800.210.310
www.bio.fiocruz.br



LEISHMANIOSE

EIE - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Bio-Manguinhos

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

EIE - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA- Bio-Manguinhos

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

(material fornecido para 384 reações)

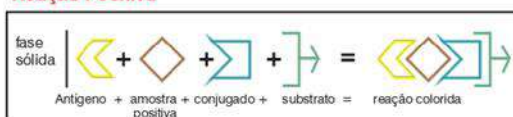
PRINCÍPIO DO TESTE:

Este ensaio consiste na reação de soros de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura "in vitro", que são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/strips (fase sólida). A seguir adicionam-se, devidamente diluídos, os soros controle do teste e as amostras a serem analisadas, que possuindo anticorpos específicos, vão se fixar aos antígenos. Na etapa seguinte, ao se adicionar uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, esta se ligará aos anticorpos caso estejam presentes.

Para evidenciação da reação, utiliza-se uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB) que pela ação da peroxidase com o peróxido de hidrogênio forma um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar-se o ácido sulfúrico que interrompe a reação, passa a apresentar uma coloração amarela, em caso positivo (reagente). Nas cavidades que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reagente).

ESQUEMA DO TESTE:

Reação Positiva



Ensaio Imunoenzimático (EIE) para Leishmaniose Canina

MODELO DE PROTOCOLO

Lote: _____ Validade: _____
EIE Nº: _____ Data: _____

Disposição das amostras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Densidade ótica das amostras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Cálculo do Cut-Off: (amostras colhidas em Papel Filtro)

Co = $\bar{X}_{CN} \times 3$

co =

Técnico Responsável: _____
Observações: _____

Ensaio Imunoenzimático (EIE) para Leishmaniose Visceral Canina

MODELO DE PROTOCOLO

Lote: _____ Validade: _____
EIE Nº: _____ Data: _____

Disposição das amostras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Densidade ótica das amostras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Cálculo do Cut-Off: (amostras de soro)

$$CO = \bar{X}_{CN} \times 2$$

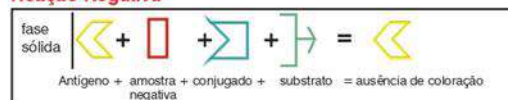
CO =

Técnico Responsável: _____
Observações: _____

EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos

3

Reação Negativa



MATERIAL FORNECIDO:

Identificação	Componentes	Apresentação
R-01	Diluyente de Amostra/Conjugado [5X]	2 Fr. 45 mL
R-02	Lecitina de leite	1 saco 10 g
R-03	Tampão de Lavagem [20X]	2 Fr. 60 mL
R-04	Diluyente do Substrato	1 Fr. 60 mL
R-05	Cromógeno (TMB)	1 Fr. 0,7 mL
R-06	Substrato (H ₂ O ₂)	1 Fr. 0,2 mL
R-07	Ácido Sulfúrico 2M	1 Fr. 30 mL
R-08	Controle Positivo	1 Fr. 0,25 mL
R-09	Controle Negativo	1 Fr. 0,25 mL
R-10	Conjugado	1 Fr. 0,4 mL
R-11	Molduras c/ 6 strips duplas sensibilizadas	4 molduras
	Folhas Adesivas	8 folhas
	Manual de Instruções de Uso	

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO:

- Água destilada.
- Vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc).
- Micropipetadores multicanal e monocanal ajustáveis e ponteiros.
- Luvas descartáveis.
- Barquetes.
- Estufa à 37°C.

4 EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos

- Sistema de vácuo com pente de lavagem, pipeta Pasteur adaptada ou lavador automático de microplacas.
- Hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária.
- Espectrofotômetro para leitura de microplacas, equipado com filtro de 450 nm.
- Balança semi-analítica.
- Caso utilize amostras em papel de filtro: picotador de 6mm e agitador rotacional

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL:

Manter a -20°C: R-08, R-09, R-10, R-11.

Manter entre 2° e 8°C: R-01, R-02, R-03, R-04, R-05, R-06 e R-07.

Todos os componentes do teste devem ser guardados nas temperaturas indicadas desde o ato do recebimento do conjunto, permanecendo estáveis pela validade definida na caixa principal do kit.

Obs.: a temperatura de transporte, com bobinas de gelo reciclável, permite que o conjunto se mantenha em condições adequadas durante 24 a 36 horas.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES:

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos, podendo representar uma fonte de infecção. Portanto, ao manusear qualquer um dos reagentes desse conjunto, observe as precauções de biossegurança necessárias.

A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento às boas práticas de laboratório, tais como:

- as amostras, assim como os controles podem conter agentes infecciosos e devem ser manipulados com cuidado;
- homogeneizar as amostras e controles antes de usar;

EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos

17

Licenciado no Min. da Agricultura sob o nº 8968/04, em 22/09/2004.
Resp. Téc. Méd. Vet.: Adenauer Cruz Teixeira | CRMV-RJ nº 1.359

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS:

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a:

Bio-Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz
CNPJ 33.781.055/0015-30
Departamento de Reativos para Diagnóstico
Av. Brasil, 4365 - CEP: 21040-900 - Rio de Janeiro - RJ
Tel: (21) 3882.9393 Fax: (21) 2561.0277
SAC: 0800.210.310
www.bio.fiocruz.br

edição: setembro de 2008
BM_014_08Bk

9. MONTOYA, A. CASTELL, J.V. Long Term Storage of Peroxidase-Lebelled Immunoglobulins for use in enzyme Immunoassay. J. Immun. Meth. 1978; 99: 13-20.
10. MORENO, J. ALVAR, J. Canine Leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. Trends in Parasitology. 2002; 18(9): 399-405.
11. NAKANE, P.K. KAWAVI, A. Peroxidase Labeled Antibody a new Method of Conjugation. J. Histochem Cytochem. 1974; 22(12):1084-1091.
12. PAPPAS, M.G. HAJKOSWSKI, R. HOCKMEYER, W.T. Dot enzyme linked immunosorbant assay (DOT-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. J. Immunol. Method. 1983; Nov 11; 64(1-2): 205-14.
13. REITHINGER, R. DAVIES, C.R. Canine Leishmaniasis: novel strategies for control. Trends in Parasitology. 2002; 18(7): 289-290.

- utilizar equipamento de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis, jaleco e protetor facial em todas as etapas do teste.
- desprezar ponteiros, luvas, pipetas de vidro, frascos, placas usadas etc. em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- nunca misturar componentes de lotes diferentes;
- para evitar interferências, nunca tocar com os dedos a parte de cima das strips;
- cada strip só pode ser utilizada uma única vez;
- soluções contendo TMB e/ou peroxidase são irritantes para pele e mucosas e não devem entrar em contato com metais;
- não usar os reativos após sua data de validade;
- utilizar frascos e vidrarias rigorosamente limpos, pois resíduos de detergentes e/ou substâncias oxidantes poderão interferir na reação

PROCEDIMENTO DO TESTE PARA AMOSTRAS DE SORO:

1 - Preparo do diluente de amostras/conjugado:

n° strips duplas	n° reações	R-01(5X)	R-02 (pesar)	H ₂ O destilada
1	até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
2	até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
3	até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
4	até 64	10 mL	1 g	40 mL
5	até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
6	até 96	14 mL	1,4g	56 mL

- 2 - Diluir em tubos 5 µL dos controles e das amostras de soros de cães a serem analisadas, previamente homogeneizadas, em 500 µL do diluente de amostra/conjugado (1:100).
- 3 - Distribuir 100 µL dos controles já diluídos da seguinte forma: na coluna 1 fileira "A" e "B" o controle positivo, na "C" e "D" o

controle negativo, na "E" e "F" somente o diluente de amostra/conjugado (sem soro) que servirá de controle do conjugado. Nos outros orifícios, distribuir 100 µL das amostras testes, já diluídas nos respectivos orifícios correspondentes (seguir protocolo).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
B	CP	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
C	CN	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
D	CN	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
E	SS	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
F	SS	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
G	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
H	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra

CP= Controle Positivo CN=Controle Negativo SS=Sem Soro

4 - Selar os "strips" com a folha adesiva e incubar a 37°C por 30 minutos.

5 - Preparo do tampão de lavagem:

Obs.: este tampão é sujeito a cristalização, neste caso, coloque em banho-maria a 37°C até a dissolução dos cristais.

a) volumes necessários quando se utiliza sistema de vácuo com pente de lavagem ou pipeta Pasteur:

n° strips duplas	n° reações	R-03	H ₂ O dest.
1	até 16	2 mL	38 mL
2	até 32	3 mL	57 mL
3	até 48	4 mL	76 mL
4	até 64	5 mL	95 mL
5	até 80	7 mL	133 mL
6	até 96	8 mL	152 mL

Leishmaniose Visceral, e ainda para Projetos de Pesquisa realizados por Instituições Públicas do País.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. ALVES, W.A. BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da Leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. Cad. S. Pub. RJ; 2004; 20(1) jan-fev: 259-265.
2. ASFOR, D.A. BADARÓ, R. EULALIO, C. *Et Al.* Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbant assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 1993; Jan; 48(1): 1-8.
3. BADARÓ, R. DUARTE, M.I.S. Leishmaniose Visceral. In: VERONESI, R. FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. 2ed. 2002; 1254-79
4. BRADFORD, M.M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976; 72.
5. BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Leishmaniose Visceral. Guia de Vigilância Epidemiológica. 2003; 527-539.
6. CARVALHO, F.A.A. CHAREST, H. TAVARES, C.A.P. *Et Al.* Diagnosis of American Visceral Leishmaniasis in human and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. Diag. Microb. And Infect. Disease. 2002; 43: 289-295
7. CUBA, C.A. MARSDEN, P.H.D. BARRETO, A. C. ROCHA, R. SAMPAIO, R.R. PATZIAFF, L. Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniose tegumentar americana. Biol. Of sanit. Param. 1980; 89: 195-208.
8. MEDRONHO, R.A. *Et Al.* Epidemiologia. 2003. Cap 18; p 259-270.

Obs.2: mantendo-se as Amostras na "faixa cinza", após a repetição, recomendamos a utilização de outras metodologias para confirmação deste resultado, que deverá ser designado como indeterminado.

CO		
AMOSTRAS NÃO REATIVAS	FAIXA CINZA	AMOSTRAS REATIVAS

VALIDAÇÃO DO TESTE:

Considerar o teste válido quando os valores (densidade ótica) estiverem na faixa descrita abaixo:

Controle Positivo > 0,500 densidade ótica

Controle Negativo > 0,050 < 0,120 densidade ótica

Repetir o ensaio se os valores citados estiverem fora do limite.

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO DO TESTE

Estudos preliminares de padronização do teste foram realizados por Bio-Manguinhos em conjunto com o Instituto Adolfo Lutz (IAL-SP). Foram identificados 130 cães com suspeita clínica de LVA dos quais foram coletadas amostras de soro e amostras coletadas em papel de filtro. Estas amostras foram testadas tanto na IFI quanto no ELISA. Para os cálculos de sensibilidade e especificidade a IFI foi considerado o teste padrão ("Gold Standard"), e os seguintes índices foram encontrados: Sensibilidade para amostras de soro dos cães: 94,54% e especificidade de 91,76%. Já para as amostras coletadas em papel de filtro os índices de sensibilidade e especificidade foram de 79,45% e 90,24% respectivamente.

DISPONIBILIDADE

Este produto destina-se prioritariamente para atendimento das demandas dos Programas Públicos de controle da

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

nº strips duplas	nº placas	R-03	H ₂ O dest.
até 3	1/2	20 mL	380 mL
até 6	1	25 mL	475 mL
até 9	1 1/2	30 mL	570 mL
até 12	2	35 mL	665 mL
até 15	2 1/2	40 mL	760 mL
até 18	3	45 mL	855 mL
até 21	3 1/2	50 mL	950 mL
até 24	4	55 mL	1045 mL

6 - Descolar cuidadosamente a folha adesiva, aspirar o conteúdo e lavar 6 vezes com tampão de lavagem (200 µL/orifício). Aguardar 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

7 - Diluir o conjugado no diluente de amostra/conjugado, preparado anteriormente. Preparo do conjugado:

nº strips duplas	nº reações	R-01 diluído	R-10
1	até 16	5 mL	5 µL
2	até 32	5 mL	5 µL
3	até 48	10 mL	10 µL
4	até 64	10 mL	10 µL
5	até 80	15 mL	1 5 µL
6	até 96	15 mL	15 µL

8 - Homogeneizar bem e distribuir 100 µL da diluição do conjugado em cada orifício dos "strips".

9 - Selar e incubar os "strips" conforme descrito no item 4 e aspirar e lavar conforme descrito no item 6.

10 - Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro.

11 - Preparo do substrato:

nº strips duplas	nº reações	R-04	R-05	R-06
1	até 16	2,5 mL	25 µL	5 µL
2	até 32	4 mL	40 µL	8 µL
3	até 48	6 mL	60 µL	12 µL
4	até 64	8 mL	80 µL	16 µL
5	até 80	10 mL	100 µL	20 µL
6	até 96	12 mL	120 µL	24 µL

12 - Distribuir 100 µL do substrato rapidamente em todos os orifícios.

13 - Incubar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos

14 - Bloquear a reação adicionando 50 µL de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, proceder a leitura.

LEITURA:

Ligar o Espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450nm para leitura e sem a utilização de filtro de referência (620-630nm). Após alguns minutos para estabilização do feixe de luz, zerar o aparelho no ar (sem a microplaca) e em seguida, iniciar a leitura da microplaca de teste.

Obs.: caso a leitura seja feita com filtro de 450nm tendo como referência outro de 620-630nm, todas as densidades óticas (DO) ficarão abaixo do esperado, prejudicando o cálculo do cut-off e causando a ocorrência de resultados falso-positivos no ensaio.

- Cálculo do Cut-Off: $CO = \bar{X} CN \times 2$
CO = Cut-Off

$\bar{X} CN$ = Média da densidade ótica dos orifícios do Controle Negativo

Obs.: o operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado

15 - Distribuir 100 µL do substrato rapidamente em todos os orifícios.

16 - Incubar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos

17 - Bloquear a reação adicionando 50 µL de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, proceder a leitura.

LEITURA:

Ligar o Espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450nm, e após alguns minutos para estabilização do feixe de luz, zerar o aparelho no ar e iniciar a leitura.

- Cálculo do Cut-Off: $CO = \bar{X} CN \times 3$
CO = Cut-Off

$\bar{X} CN$ = Média da densidade ótica dos orifícios do Controle Negativo

Obs.: o operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado (SS) não poderá ser superior a 1,5 x DO obtida para o soro controle negativo.

RESULTADOS

Amostras reagentes = As que apresentarem densidade ótica igual ou superior ao Cut-Off.

Amostras não reagentes = As que apresentarem densidade ótica inferior ao Cut-Off.

Obs.1: recomendamos a repetição das amostras que apresentarem densidade ótica na "faixa cinza", considerada neste teste, entre o valor obtido para o Cut-Off e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2.

nº strips duplas	nº placas	R-03	H ₂ O dest.
até 3	1/2	20 mL	380 mL
até 6	1	25 mL	475 mL
até 9	1 1/2	30 mL	570 mL
até 12	2	35 mL	665 mL
até 15	2 1/2	40 mL	760 mL
até 18	3	45 mL	855 mL
até 21	3 1/2	50 mL	950 mL
até 24	4	55 mL	1045 mL

9 - Descolar cuidadosamente a folha adesiva, aspirar o conteúdo e lavar 6 vezes com tampão de lavagem (200 µL /orifício). Aguarde 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

10 - Preparo do conjugado:

nº strips duplas	nº reações	R-01 diluído	R-10
1	até 16	5 mL	5 µL
2	até 32	5 mL	5 µL
3	até 48	10 mL	10 µL
4	até 64	10 mL	10 µL
5	até 80	15 mL	15 µL
6	até 96	15 mL	15 µL

11 - Homogeneizar bem e distribuir 100 µL da diluição do conjugado em cada orifício dos "strips".

12 - Selar e incubar os "strips" conforme descrito no item 7 e aspirar e lavar conforme descrito no item 9.

13 - Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro.

14 - Preparo do substrato:

nº strips duplas	nº reações	R-04	R-05	R-06
1	até 16	2,5 mL	25 µL	5 µL
2	até 32	4 mL	40 µL	8 µL
3	até 48	6 mL	60 µL	12 µL
4	até 64	8 mL	80 µL	16 µL
5	até 80	10 mL	100 µL	20 µL
6	até 96	12 mL	120 µL	24 µL

nº strips duplas	nº reações	R-01 (5X)	R-02 (pesar)	H ₂ O destilada
1	até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
2	até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
3	até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
4	até 64	10 mL	1 g	40 mL
5	até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
6	até 96	14 mL	1,4 g	56 mL

2 - Em tubos previamente descontaminados, limpos e secos, colocar 2 picotes (6mm) de cada amostra coletada em papel de filtro Whatman nº1 ou 1 picote (6 mm) para papel filtro Klabin 80, nos tubos correspondentes.

3 - Adicionar 400 µL de diluente de amostra/conjugado por tubo, para as amostras coletadas em papel Whatman nº1 ou 500 µL para amostras coletadas em papel Klabin 80.

4 - Colocar a estante de tubos em agitador rotacional para eluir as amostras coletadas em papel de filtro. Deixar os tubos em leve agitação por 1 hora.

5 - Diluir em tubos, 5 µL dos soros controle positivo e negativo, previamente homogeneizados, em 500 µL do diluente de amostra/conjugado (1:100).

6 - Distribuir 100 µL dos controles e das amostras eluídas da seguinte forma: na coluna 1 fileira "A" e "B" o soro controle positivo, na "C" e "D" o controle negativo, na "E" e "F" somente o diluente de amostra/conjugado (sem soro) que servirá de controle do conjugado. Nos outros orifícios, distribuir 100 µL das amostras teste já eluídas, nos respectivos orifícios correspondentes (seguir protocolo).

(SS) não poderá ser superior a 1,5 x DO obtida para o soro controle negativo.

RESULTADOS

Amostras reagentes = As que apresentarem densidade ótica igual ou superior ao Cut-Off.

Amostras não reagentes = As que apresentarem densidade ótica inferior ao Cut-Off.

Obs. 1: recomendamos a repetição das amostras que apresentarem densidade ótica na "faixa cinza", considerada neste teste, entre o valor obtido para o Cut-Off e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2.

Obs. 2: mantendo-se as Amostras na "faixa cinza", após a repetição, recomendamos a utilização de outras metodologias para confirmação deste resultado, que deverá ser designado como indeterminado.

AMOSTRAS NAO REATIVAS	FAIXA CINZA	AMOSTRAS REATIVAS
-----------------------	-------------	-------------------

VALIDAÇÃO DO TESTE:

Considerar o teste válido quando os valores da densidade ótica estiverem na faixa descrita a seguir:

- Controle Positivo: $\geq 0,500$ de DO

- Controle Negativo: $\geq 0,050 \leq 0,120$ de DO

Repetir o ensaio se os valores citados estiverem fora do limite.

PROCEDIMENTO DO TESTE PARA AMOSTRAS COLHIDAS EM PAPEL FILTRO:

1 - Preparo do diluente de amostras/conjugado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
B	CP	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
C	CN	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
D	CN	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
E	SS	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
F	SS	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
G	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
H	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra

CP= controle Positivo CN= Controle Negativo SS= Sem Soro

7 - Selar os "strips" com a folha adesiva e incubar a 37°C por 30 minutos.

8 - Preparo do tampão de lavagem:

Obs.: este tampão é sujeito a cristalização, neste caso, coloque em banho-maria a 37°C até a dissolução dos cristais.

a) volumes necessários quando se utiliza sistema de vácuo com pente de lavagem ou pipeta Pasteur:

nº strips duplas	nº reações	R-03	H ₂ O dest.
1	até 16	2 mL	38 mL
2	até 32	3 mL	57 mL
3	até 48	4 mL	76 mL
4	até 64	5 mL	95 mL
5	até 80	7 mL	133 mL
6	até 96	8 mL	152 mL

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS - CEP SH

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Leishmaniose visceral canina: Soroprevalência e georreferenciamento no estado de Santa Catarina, Brasil.

O (a) senhor (a) está sendo convidado a participar de um estudo que fará a avaliação da prevalência sorológica de leishmaniose visceral canina no estado de Santa Catarina. Será realizada coleta de sangue por meio de punção da veia jugular/cefálica dos animais amostrados. O material será devidamente identificado, acondicionado e transportado ao laboratório para análise. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Os riscos deste procedimento são mínimos, não envolvendo risco ao animal.

Sua identidade será preservada, havendo apenas a necessidade de fornecer o endereço do animal, sendo este identificado através de número de protocolo e ficha clínica.

Os benefícios serão o conhecimento da prevalência da infecção por *Leishmania infantum* em cães no estado de Santa Catarina e identificação de possíveis fatores de risco para a doença. Estas são informações importantes para a implementação de medidas de prevenção que implicam em melhorias na sanidade dos cães. Os exames não terão custo.

Solicitamos vossa autorização para coleta de sangue bem como o uso destes dados para a produção de artigos técnicos e científicos. A sua privacidade será mantida através de não identificação do seu nome.

Agradecemos a vossa participação.

Pessoa contato: Prof. Anderson Barbosa de Moura- (pesquisador responsável). Número do telefone: 49 3289 9316. Doutoranda Camila Zomer Spindola – Número de telefone – 48 99688 7878.

Endereço: Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do CAV/UDESC
Av. Luís de Camões, 2090 – Bairro Conta Dinheiro – Lages, SC.

Protocolo N°: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa e, que recebi de forma clara e objetiva todas as explicações pertinentes ao projeto e, que todos os dados a meu respeito serão sigilosos. Eu compreendo que neste estudo, as medições dos experimentos/procedimentos serão feitos em meu animal.

Declaro que fui informado que posso me retirar do estudo a qualquer momento.

Nome por extenso

_____, ____/____/____
(Localidade)

Assinatura

ANEXO IV

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
DOUTORADO EM PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

Nº DA AMOSTRA:

DATA: / /

1. IDENTIFICAÇÃO DA CLÍNICA E/OU PROPRIETÁRIO

NOME:
ENDEREÇO:
TELEFONE:

2. IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

NOME:	IDADE:	
ENDEREÇO:	SEXO: () M () F	

3. HISTÓRIA CLÍNICA

PROCEDÊNCIA: () ADOTADO () COMPRADO
VACINAÇÃO PARA LEISHMANIOSE: () SIM () NÃO
COLEIRA (OU OUTRA FORMA) CONTROLE MOSQUITOS () SIM () NÃO

4. TIPO DE HABITAÇÃO

AMBIENTE EM QUE O ANIMAL VIVE:		
() QUINTAL	() APARTAMENTO	() CASA
() CANIL/CRIADOURO () ABRIGO DE ANIMAIS		
HÁBITOS DO ANIMAL:		
() VIVE APENAS NO INTERIOR DA RESIDÊNCIA () ANIMAL DE RUA		
() VIVE APENAS NO EXTERIOR DA CASA		
POSSUI ACESSO À RUA? () SIM () NÃO		

5. PRESENÇA DE SINAIS CLÍNICOS

() PERDA DE APETITE	() EMAGRECIMENTO
() CAQUEXIA	() ONICOGRIFOSE
() ALOPECIA	() ALTERAÇÕES OFTÁLMICAS
() EDEMA DE MEMBROS	() HEPATOMEGALIA
() LINFADENOPATIA	() ESPLENOMEGALIA
() OUTROS QUAL?	
() SINTOMÁTICO () OLIGOSINTOMÁTICO () ASSINTOMÁTICO	

OBSERVAÇÕES PERTINENTES: