



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA EM PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
PARASITÁRIA**

Ana Carolina Amado Gomes

**Avaliação do antígeno rKDDR-Plus para o diagnóstico da
Leishmaniose Visceral Canina em abrigos de animais de
Aracaju/SE**

**São Cristóvão
2020**

Ana Carolina Amado Gomes

**Avaliação do antígeno rKDDR-Plus para o diagnóstico da
Leishmaniose Visceral Canina em abrigos de animais de
Aracaju/SE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da Universidade Federal de Sergipe como pré-requisito para a obtenção do grau de mestre.

Orientador: Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Coorientador: Dr. Silvio Santana Dolabella

Linha De Pesquisa: Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias

**São Cristóvão
2020**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

G633a Gomes, Ana Carolina Amado
Avaliação do antígeno rKDDR-Plus para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em abrigos de animais de Aracaju/SE / Ana Carolina Amado Gomes; orientador Ricardo Toshio Fujiwara – São Cristóvão, 2020.
61 f.; il.

Dissertação (mestrado em Biologia parasitária) –
Universidade Federal de Sergipe, 2020.

1. Biologia. 2. Leishmaniose visceral. 3. Sorologia. 4. Antígenos. 5. Aracaju (SE). I. Fujiwara, Ricardo Toshio, orient.
II. Título.

CDU: 573(813.7)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Av. Mal. Rondon s/n - Rosa Elze - São Cristóvão - SE
CEP 49.100-000 - Tel. (79)2105.6340
E-mail: probp.ufs@gmail.com



Ata da Sessão da 78ª Defesa do Curso de Mestrado em Biologia Parasitária

Ao vigésimo-sexto dia do mês de maio de dois mil e vinte, com início as nove horas, realizou-se remotamente, via videoconferência, a sessão pública de defesa de dissertação de Mestrado em Biologia Parasitária de Ana Carolina Amado Gomes, intitulada "**Avaliação do antígeno rKDDR-Plus para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina em abrigos de animais de Aracaju/SE**", orientada pelo Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara (PROBP/UFS). Aberta a sessão, o Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, Presidente da Banca Examinadora, passou a palavra à candidata para a apresentação pública de seu trabalho. Em seguida, o Presidente passou a palavra ao primeiro examinador, Dr. João Luis Reis Cunha (UFMG), para arguição da candidata, que teve igual período para sua defesa. O mesmo aconteceu com a segunda examinadora, Profa. Dra. Roseli La Corte dos Santos (PROBP/UFS). Ao término da arguição dos examinadores, o Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara agradeceu os comentários e sugestões dos membros da banca. Encerrados os trabalhos, a banca examinadora deliberou sobre a aprovação da candidata. A banca concedeu o parecer Aprovada à candidata, sendo atendidas as exigências da Instrução Normativa 05/2015/PROBP e da Resolução nº 86/2014/CONEP, que regulamentam a apresentação e defesa de Dissertação de Mestrado. Nada mais havendo a tratar, o Orientador lavrou a presente ata que será assinada pelos examinadores e pela candidata.

Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, 26 de maio de 2020

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara (PROBP/UFS) Presidente

Dr. João Luis Reis Cunha (UFMG) Examinador
Externo

Profa. Dra. Roseli La Corte dos Santos (PROBP/UFS)
Examinadora Interna

Ana Carolina Amado Gomes Mestranda

Dedico este trabalho a todos os animais.

*“Eles já nascem sabendo amar de uma
maneira que nós levamos a vida inteira para
aprender...”*

AGRADECIMENTOS

À Deus o dom da vida e aos espíritos de luz por me guiarem diante dos caminhos, me possibilitando diariamente evoluir como ser humano!

Aos meus pais, Lúcia e José Luiz, por toda dedicação, paciência, respeito e amor durante toda minha vida! Obrigada por acreditarem nos meus sonhos! AMO vocês com toda força do meu coração! Vocês são meus heróis!

Ao meu namorado Leo por TUDO! Não tenho como enumerar aqui todas as coisas feitas por e para mim durante esses anos de relacionamento. Obrigada por todas as conversas sobre bioestatística, por ficar comigo até tarde estudando ou na UFS nos dias de laboratório. Obrigada pela parceria, por dividir comigo todas as incertezas e me fazer sentir mais segura. Pode ter certeza que o caminhar foi mais leve e bonito por te ter ao meu lado. Você é MARAVILHOSO! Te amo!

A todos os cachorrinhos que fizeram parte desse estudo! Fazer o bem para vocês me motivou diariamente e mesmo nos dias mais difíceis o trabalho me fez feliz! Sem vocês nada disso seria possível!

A Cida e Fabiana por toda troca de conhecimento na prática. Independente das adversidades vocês estavam presentes. Muito obrigada!

Ao meu orientador Ricardo Fujiwara, agradeço IMENSAMENTE pela humanidade e respeito. Por acreditar no meu progresso e me permitir crescer como professora e pesquisadora. Por todo incentivo, disponibilidade e pela credibilidade dada a mim desde o primeiro contato. Pelo acesso e oportunidade de conhecer seu laboratório, por me ensinar que “a persistência é a característica mais importante na ciência”. Você é um exemplo de pessoa e profissional, muito obrigada por acreditar em mim!

Ao meu coorientador Silvio Dolabella, dono de um coração enorme, por estar presente e sempre disponível. Por me ajudar com resumos, tirando dúvidas, por viabilizar minha ida para BH e acreditar nas minhas ideias malucas envolvendo cachorrinhos e flebótomos. Muito obrigada!

A todos os professores que de alguma maneira contribuíram para minha formação de mestra, em especial Rodrigo e Roseli. Obrigada por toda disponibilidade, paciência, educação, sensibilidade e coerência, demonstrados dentro e fora de sala de aula. Aprender com vocês foi revigorante e incentivador. Vocês são nota 1000!

A toda turma “Tá aqui porque quer” em especial Thayane, Anne e Rebeca. Quando o caminho é longo, muitas vezes constância é mais importante que velocidade. Dividir todo esse percurso com vocês foi uma honra! Vocês são INCRÍVEIS!

A todos do LEPaT, em especial Lu Maria, Yvanna, Yrna e Gabi. Vocês são minha meninas superpoderosas e nem mesmo um artigo A1, sem limite de caracteres, seria suficiente para expressar em palavra todos os tipos de apoio que recebi ao longo dessa caminhada. Vocês merecem o mundo! Estamos juntas e SOMOS FORTE!

Aos novos amigos que tornaram minha estadia em BH mais agradável, em especial Gisa, fez com que eu me sentisse em casa. Obrigada pelo “cafezin”, por emprestar seus gatinhos, pelas conversas, risadas e pela amizade. Você é muito especial!

Aos colegas do laboratório em BH, principalmente Michele e Flavis. Obrigada pela PACIÊNCIA e por toda ajuda, nunca vou esquecer tudo que vocês fizeram por mim!

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

“Nós, seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar. Portanto quem chuta ou maltrata um animal é alguém que não aprendeu a amar.”

Chico Xavier

RESUMO

AMADO-GOMES, A. C. **Avaliação do antígeno rKDDR-Plus para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina em abrigos de animais de Aracaju/SE.** Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em biologia parasitária - UFS, São Cristóvão, 2020.

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença tropical negligenciada que pode levar a morte caso não seja diagnosticada e tratada corretamente. O cão doméstico é considerado o reservatório mais importante devido a sua proximidade com o homem. O diagnóstico correto do reservatório canino é de suma importância para controlar a transmissão da doença. A fim de aprimorar o diagnóstico da LV canina, foi desenvolvido um antígeno recombinante constituído por 15,3 motivos repetitivos e 39 aminoácidos da kinesina denominado rKDDR-Plus. O objetivo deste estudo foi avaliar o antígeno rKDDR-Plus para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina em cães mantidos em abrigos de Aracaju/SE. Foi utilizada como padrão ouro, a PCR para *Leishmania* sp. O teste imunocromatográfico de rKDDR-Plus mostrou maior sensibilidade (57%); comparado ao DPP Bio-Manguinhos® (45%). Ambos os testes obtiveram a mesma especificidade (69%). O rKDDR-Plus apresentou maior acurácia em diagnosticar cães para LV em área endêmica quando comparado ao teste rápido utilizado atualmente na realização na triagem A ELISA rKDDR apresentou maior sensibilidade, 49% com IC de 95%: 40.71-57.78; já a ELISA rKDDR-Plus apresentou maior especificidade, 81% com IC de 95%: 62.12-91.49. Quando comparada com os outros dois testes, o rKDDR-Plus apresentou a maior área da curva ROC, seguida por Extrato Bruto e rKDDR. Conclui-se que o rKDDR-Plus pode ser utilizado como ferramenta para diagnosticar a LVC.

Palavras-chaves: Kala-azar; *Leishmania infantum*; Sorologia; Proteína recombinante.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is a neglected tropical disease that can lead to death if not properly diagnosed and treated. The domestic dog is considered the most important reservoir due to its proximity to man. Correct reservoir diagnosis is important to control disease transmission. In order to improve or diagnose the LV canine, a recombinant antigen was developed consisting of 15.3 repeated motifs and 39 kinin amino acids called rKDDR-Plus. The aim of this study was to evaluate the rKDDR-Plus antigen for the diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis in dogs kept in shelters in Aracaju / SE. As a gold standard, a PCR for *Leishmania* sp. The rKDDR-Plus immunochromatographic test showed greater sensitivity (57%); compared to DPP Bio-Manguinhos® (45%). Both testicles have the same specificity (69%). The rKDDR-Plus was more accurate in dogs diagnosed with VL in endemic areas when it heard a rapid test and currently uses the screening ELISA rKDDR is more sensitive, 49% with 95% CI: 40.71-57.78; in the ELISA rKDDR-Plus, it showed greater specificity, 81% with 95% CI: 62.12-91.49. When compared to the other two tests, rKDDR-Plus showed the largest area of the ROC curve, followed by Gross Extract and rKDDR. Conclude that rKDDR-Plus can be used as a tool to diagnose a CVL.

Keywords: Kala-azar; *Leishmania infantum*; Serology; Recombinant Protein.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XIV
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Delineamento experimental.....	22
3.2. Considerações éticas.....	22
3.3. Área de estudo	22
3.4. Instalações	23
3.5. Cálculo amostral	23
3.6. Seleção e contenção dos cães	24
3.7. Avaliação clínica dos animais	24
3.8. Coleta sanguínea.....	25
3.9. Triagem sorológica por testes rápidos	25
3.9.1. Teste imunocromatográfico DPP Bio-Manguinhos®	25
3.9.2. Teste imunocromatográfico rKDDR-PLUS	26
3.10. Padronização de ELISA.....	26
3.11. Diagnóstico molecular.....	27
3.11.1. Extração de DNA das amostras de sangue total.....	27
3.11.2. PCR para diagnóstico de <i>Leishmania sp</i>	28
3.11.3. PCR para diagnóstico de <i>Babesia spp</i>	28
3.11.4. PCR quantitativa (qPCR) para determinação da carga parasitária.....	29
3.12. Análise estatística	29
4. MANUSCRITO A SER SUBMETIDO.....	31
RESUMO	32
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
RESULTADOS	39
DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÃO.....	47

REFERÊNCIAS	49
5. REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	57
Anexo I. Aprovação do Comitê de ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Sergipe	58
Anexo II. Termo de Consentimento Livre Esclarecido	58
APÊNDICES	61
APENDICE I. Ficha de avaliação clínica dos cães (uma ficha por cão).....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Acurácia

AUC – “Area Under the Curve” (Área Sob a Curva)

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CN – Controle Negativo

CP – Controle Positivo

DAT – “Direct Agglutination Test” (Teste de Aglutinação Direta)

EDTA – “Ethylenediamine tetraacetic acid” (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)

EIE – Ensaio Imuno Enzimático

ELISA – Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima

FN – Falso Negativo

FP – Falso Positivo

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IgG – *gama* Imunoglobulina

IR – Índice de Reatividade

KDDR – “Kinesin Degenerated Derived Repeat” (Repetição Degenerada Derivada de Kinesina)

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

LVH – Leishmaniose Visceral Humana

OPD – “o-phenylenediamine dihydrochloride”

OR – “Odds Ratio” (Razão de Chance)

pb – Pares de Base

PBS – “Phosphate Buffered Saline” (Solução Salina de Tampão Fosfato)

PCR – “Polymerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia da Polimerase)

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

ROC – “Receiver Operating Characteristic” (Característica de Operação do Receptor)

TCLE – Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TIC – Teste imunocromatográfico

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do Teste Rápido Imunocromatográfico de fluxo lateral rKDDR-Plus	20
Figura 2 – A) Mapa do Brasil com destaque para a região Nordeste. B) Mapa do estado de Sergipe; C) Mapa do município de Aracaju	22
Figura 3 – Instalações dos abrigos; diferentes setores onde os cães permanecem	23
Figura 4 – Corda utilizada como contenção para prevenção de mordidas dos cães.....	24
Figura 5 – Barbante amarrado utilizado como ferramenta de marcação	25
Figura 6 – Imunocromatografia de dupla migração DPP Bio-Manguinhos®.....	26
Figura 7 – Imunocromatografia de fluxo lateral rKDDR-Plus®.....	26
Figura 8 – Comparação da reatividade dos soros de cães nos testes de ELISA da rKDDR, rKDDR-Plus e Extrato Bruto de <i>Leishmania infantum</i>	41
Figura 9 – Comparação das curvas ROC obtidas de cada teste: ELISA da rKDDR, rKDDR-Plus e Extrato Bruto de <i>Leishmania infantum</i>	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concordância entre os testes imunocromatográficos e a PCR para <i>Leishmania infantum</i>	41
Tabela 2 – Percentuais de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia dos ensaios imunoenzimáticos ELISA da rKDDR, rKDDR-Plus e Extrato Bruto de <i>Leishmania infantum</i> em soros caninos para diagnóstico da LV.....	43
Tabela 3 – Concordância dos testes de ELISA da rKDDR, rKDDR-Plus e Extrato Bruto de <i>Leishmania</i> sp. com o diagnóstico molecular para LVC	43
Tabela 4 – Sinais e sintomas para LVC descritos de acordo com avaliação clínica ...	44
Tabela 5 – Análise de Odds Ratio e razão de prevalência entre a presença de um sinal clínico ou sintoma e ser positivo para LVC pela PCR.....	45

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* (Ross, 1903). A Leishmaniose Visceral (LV) ou popularmente conhecida como kala-azar (calazar), é considerada a forma mais grave da doença, pois pode levar a morte caso não seja corretamente diagnosticada e tratada. Causada por *Leishmania infantum* no Novo Mundo e *Leishmania donovani* no Velho Mundo, ambas pertencem ao complexo *Leishmania donovani* (Akhoundi *et al.*, 2016), contudo já foi sugerido que a LV pode ser causada por outras espécies, como *Leishmania amazonensis* (Lukeš *et al.*, 2007).

No Brasil, a LV possui caráter zoonótico, seu agente etiológico é a *Leishmania infantum* e o cão doméstico é considerado o principal reservatório da doença. A proximidade entre cão e homem eleva as chances de dispersão da doença, pois os casos de leishmaniose visceral humana (LVH) são precedidos por casos de leishmaniose visceral canina (LVC), evidenciando a importância do cão para a transmissão da doença e a manutenção do ciclo urbano (Dantas-Torres *et al.*, 2019; Travi *et al.*, 2018). A transmissão da doença no Brasil ocorre através da picada do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, que inocula as formas infectantes no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (Rêgo *et al.*, 2015). Porém, em áreas onde esta espécie não é encontrada, outras formas de transmissão podem estar associadas, como transfusão sanguínea (De Freitas *et al.*, 2006), transplacentária (Royspal *et al.*, 2005), transmissão venérea (Silva *et al.*, 2009) e por pulgas e carrapatos (Zanatta Coutinho *et al.*, 2005; Paz *et al.*, 2010). Na América do Sul, a LV foi descrita em lobos-guará *Chrysocyon brachyurus*, cães-do-mato *Speothos venaticus* (Tolentino *et al.*, 2019; Mol *et al.*, 2015), rato preto *Rattus rattus*, raposa carnívora *Cerdocyon thous* (Quinnell *et al.*, 2009) e macacos (de Oliveira *et al.*, 2019); porém, a confirmação desses hospedeiros como reservatórios primários ou secundários necessita de mais estudos a nível populacional.

Devido ao processo de urbanização, os animais domésticos se tornaram uma peça importante na manutenção do ciclo urbano. O cão doméstico *Canis lupus familiaris*, diferentemente dos reservatórios naturais, desenvolve a doença, com risco de morte para o animal. A epidemiologia da LVC varia de acordo com a região e fatores como ocupação recente e urbanização inadequada de áreas periurbanas; processos de migração constante e desmatamento explicam o aumento da incidência em áreas antes não endêmicas para a doença, uma vez que ocasionaram mudança nos hábitos alimentares do flebotomíneo, fazendo com que fêmeas passassem a se alimentar do sangue de cães domésticos como uma alternativa viável (Dantas-Torres, 2009; Campos *et al.*, 2017).

Cães aparentemente saudáveis podem ter a LVC; mesmo positivos sorologicamente, não apresentam sinais clínicos que demonstram a infecção, podendo vir a desenvolver a doença futuramente. Recentemente, pesquisas apontaram que as cargas parasitárias entre cães saudáveis e doentes não apresentaram diferenças significativas, porém os cães doentes e com sinais clínicos apresentaram mais parasitos na pele (Laurenti *et al.*, 2013). Os principais sinais clínicos da LVC são perda de peso, letargia, atrofia muscular, anemia, linfadenomegalia, esplenomegalia, epistaxe, diarreia, disfunção hepática e/ou renal, lesões oculares, poliartrite, onicogribose e lesões na pele. As lesões na pele são caracterizadas principalmente por descamações, eczema, ulcerações localizadas frequentemente na orelha, focinho e cauda, além de opacidade no pelo. Na fase avançada da doença, o animal geralmente apresenta hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, ceratoconjuntivite, apatia, vômito, coriza, edema nos membros, hemorragia intestinal e hiperqueratose. Já na fase terminal ocorre insuficiência renal, paralisia dos membros posteriores, inanição, caquexia e morte (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Dantas-Torres e Otranto, 2014).

Devido à complexidade da relação parasito, vetor e hospedeiros e tendo em vista os dados alarmantes sobre a doença, o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral, juntamente com a Secretaria de Vigilância da Saúde, baseada em orientações estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde, formulou estratégias como manejo do inseto vetor, monitoramento, diagnóstico e eutanásia do reservatório animal e tratamento precoce e adequado para humanos infectados, a fim de controlar a doença (Ministério da Saúde, 2014). Apesar de todas as estratégias para controle da LV, a incidência da doença vem aumentando e achados recentes apontam que a infecção em cães é um elemento essencial para a disseminação da doença em humanos (Costa *et al.*, 2013).

A medida de controle recomendada para cães positivos é a eutanásia; porém, estudos mostram que essa medida possui impacto limitado. Durante quatro anos, mais de 80 mil cães foram eutanasiados no Brasil, mas a incidência da doença humana aumentou mais de 100%. A baixa sensibilidade e especificidade, a reatividade cruzada dos testes sorológicos (utilizados a fim de selecionar os cães a serem eutanasiados), a pequena adesão dos donos em eutanasiar seus cães soropositivos e a rápida substituição dos cães sacrificados por filhotes suscetíveis, podem ser motivos responsáveis pelo fracasso dessa estratégia de controle (Dantas-Torres, 2009; Alvar *et al.*, 2012).

Coleiras repelentes impregnadas com deltametrina 4% são utilizadas como medidas de prevenção individual; porém, o alto custo e acompanhamento do tempo de vida útil tornam difícil a aplicabilidade como medida de controle em cães de rua e/ou que vivem em ambiente

rural e em abrigos que possuem um alto número de animais (Leite *et al.*, 2018). Recentemente, vacinas utilizando células vivas e mortas e vacinas antigênicas recombinantes estão sendo desenvolvidas; entretanto, existe apenas uma vacina canina comercialmente disponível (Leish-tec®). Essa vacina é licenciada apenas para profilaxia individual, recomendada para cães saudáveis e mostrou efeitos promissores, mas é necessária realizar otimização para condições em campo devido a dificuldade de medir com precisão as respostas imunes, particularmente ao discriminar a resposta da vacina por anticorpos induzidos. Estudos recentes demonstraram que a vacinação de cães pode não ter impacto em áreas de alta transmissão para LVC e a utilização de vacinas não eficazes representa ameaça, pois não são completamente esterilizantes e permitem que cepas mais virulentas sobrevivam e sejam transmitidas (Grimaldi Jr *et al.*, 2017; Velez *et al.*, 2020).

O diagnóstico clínico da LVC se baseia em sinais clínicos (em geral não patognomônicos) em associação a dados epidemiológicos e exames laboratoriais, que podem incluir métodos sorológicos e moleculares. Porém, de forma individual, nenhum método diagnóstico se mostrou eficaz, sendo necessária a associação de métodos para uma comprovação satisfatória (Freitas *et al.*, 2012). O método parasitológico direto consiste na visualização de formas amastigotas em esfregaços confeccionados a partir de aspirados de linfonodos, medula óssea, pele, sangue, baço e fígado. Possui alta especificidade e sensibilidade dependente do tipo de material biológico coletado, tempo de leitura da lâmina, experiência do microscopista e nível de parasitismo do animal, sendo maior em cães sintomáticos. Contudo a técnica é demorada, invasiva, arriscada para o cão e necessita de mão de obra qualificada (Laurenti *et al.*, 2013).

Com o propósito de evitar métodos de coleta dolorosos e perigosos para o cão, surgiram os métodos moleculares. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) identifica e amplifica sequências de DNA de forma seletiva, possui boa precisão e permite a utilização de diferentes materiais biológicos como cortes histológicos, aspirado de linfonodos, medula óssea, biópsia cutânea e sangue (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A PCR quantitativa (qPCR) possibilita a observação das amplificações de DNA durante o transcorrer da reação, possibilitando assim a eliminação da fase de preparo do gel para eletroforese, fase necessária durante a realização do PCR convencional. Entretanto, os métodos moleculares possuem alto custo econômico, mão de obra qualificada, laboratórios equipados e não são aplicáveis em campo (Campino, 2008; Cavalcanti *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2012).

Uma alternativa são os ensaios sorológicos como o Teste de Aglutinação Direta (DAT) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). O DAT utiliza promastigotas inteiros que são

incubados com soro dos cães e posteriormente se observa aglutinação; é um método altamente sensível (94,8%), com boa especificidade (85,9%) e baixo custo econômico. Porém, sua realização necessita de pipetagem múltipla, tempo de incubação longo, além da possibilidade de reação cruzada gerando resultados falso-positivos. A RIFI, anteriormente considerada padrão ouro, busca anticorpos através de antígenos de promastigotas inteiros. Este método diagnóstico apresenta sensibilidade de 82% a 95% e especificidade 78% a 92%. Para sua execução é necessário utilizar microscópio de fluorescência, o resultado pode apresentar reatividade cruzada (principalmente com Doença de Chagas e Leishmaniose Tegumentar) e a interpretação do resultado é subjetiva, pois depende da experiência do microscopista (Rosário *et al.*, 2005; Maia *et al.*, 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2014).

O teste sorológico ELISA baseia-se na reação de anticorpos presentes no soro com antígenos solúveis e purificados obtidos de cultura *in vitro*. Dependendo do antígeno, a sensibilidade pode chegar a 100% e a especificidade a 96% (Solano-Gallego *et al.*, 2014). Para sua realização é necessária mão de obra qualificada e equipamentos sofisticados que necessitam da utilização de energia elétrica, tornando inviável sua aplicabilidade em campo. Além disso, as limitações do teste devido à preparações antigênicas realizadas a partir de promastigotas inteiros ou seus extratos solúveis restringem a reprodutibilidade e padronização do teste (Rosário *et al.*, 2005).

A reatividade cruzada em testes sorológicos de LVC pode levar a resultados errados. Cães altamente debilitados com baixa produção de anticorpos podem gerar resultados falso-negativos, assim como a presença de outro patógeno pode gerar resultados falso-positivos em consequência da baixa especificidade. No sudeste do Brasil, casos de cães co-infectados por *L. infantum* e *L. braziliensis*, ou outro tripanossomatídeo, foram relatados (Dantas-Torres, 2009; Campos *et al.*, 2017). Agentes infecciosos como *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* apresentaram reatividade cruzada com testes sorológicos para LVC, diagnosticando cães equivocadamente como positivos (Zanette *et al.*, 2014).

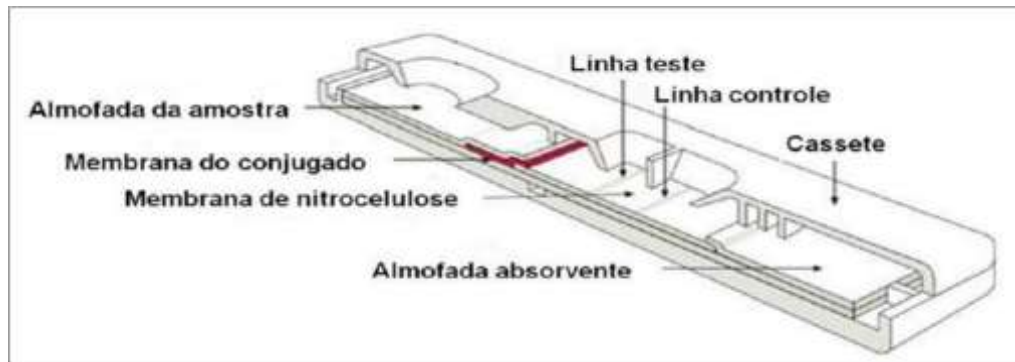
Dispositivos imunocromatográficos realizam a detecção de anticorpos em sangue, plasma ou soro através de antígeno recombinante presente na fita teste. O Teste Rápido Imunocromatográfico (TIC) é um método diagnóstico qualitativo que detém sensibilidade de 60% a 100% e especificidade de 70% a 100%, possui boa aplicabilidade em campo, fácil execução por não necessitar de mão de obra qualificada, concede rapidamente o resultado (15 – 20 minutos), tem baixo custo financeiro e é excelente para realizar triagem em massa. Podem ocorrer resultados falso-positivos devido a reação cruzada com outras patologias e falso-negativos em cães assintomáticos (Miró *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2008). No presente momento,

o dispositivo imunocromatográfico de dupla migração, ou duplo percurso (dual path platform), DPP Bio-Manguinhos é a primeira opção de teste rápido para realizar o diagnóstico em inqueritos caninos. O resultado é rapidamente viabilizado (15 minutos), pode-se utilizar amostras biológicas como soro, plasma e sangue total e não é necessária mão de obra especializada para a sua execução (Siqueira, 2018).

Recentemente, uma série de antígenos recombinantes tem sido testados e caracterizados a fim de melhorar o diagnóstico da LVC, com destaque para os antígenos rK39, rK9, rK26 e rK28, derivados da kinesina de *L. infantum* e rKRP42, rKE16 e rKLO8 de *L. donovani* (Sarkari, Rezaei, Mohebbali, 2018). Kinesinas são proteínas motoras que exercem importante papel de regular processos mitóticos e o comprimento do flagelo nas espécies de *Leishmania*. A proteína recombinante K39 possui alta antigenicidade relacionada a motivos repetidos de sequências de aminoácidos de kinesina. Porém, apesar da sua utilização contínua, seu desempenho em diagnosticar a doença não se mostrou eficaz (Faria *et al.*, 2015).

Denominado rKDDR, um antígeno recombinante com 8,5 motivos repetidos da proteína kinesina, além de 19 aminoácidos da porção não repetitiva desta mesma proteína, gerou melhoria no teste diagnóstico para a LVC (Dhom-Lemos *et al.*, 2019). A fim de alcançar um resultado superior para o diagnóstico da LVC, foi desenvolvido outro antígeno recombinante constituído por 15,3 motivos repetitivos e 39 aminoácidos da kinesina denominado rKDDR-Plus. O teste por imunocromatografia de fluxo lateral oriundo deste antígeno recombinante é representado por uma fita de nitrocelulose com duas extremidades compostas de fibras de celulose denominadas almofada da amostra – na qual, de forma adjacente, é depositada a amostra e a solução tampão da amostra, e almofada absorvente – com a função de absorver fluxos excessivos. A linha teste contém o antígeno KDDR-Plus e a linha controle possui biotina. Na membrana do conjugado tem-se estreptavidina e rKDDR-Plus ligadas ao ouro coloidal. Com a adição de soro canino na almofada da amostra, o fluxo na fita carrega os anticorpos que se ligam na rKDDR-Plus marcada com ouro coloidal. A estreptavidina vai se ligar a biotina na linha controle a fim de confirmar que houve fluxo da amostra. Com a adição da solução tampão na almofada da amostra, a rKDDR-Plus marcada é carregada se ligando a linha teste. Dessa forma, a reação é revelada pelo próprio antígeno e não por um anti-IgG secundário, funcionando para qualquer espécie (**FIGURA 1**).

Figura 1 – Representação esquemática do Teste Rápido Imunocromatográfico de fluxo lateral rKDDR-Plus



Fonte: Siqueira. 2018.

Nos últimos anos, o grupo de pesquisa do Prof. Ricardo Fujiwara vem estudando o papel das repetições altamente antigênicas em proteínas recombinantes para o sorodiagnóstico da LVC. Acredita-se que quanto maior a quantidade de motivos repetitivos em uma proteína de kinesina, maior será a capacidade antigênica, tornando-a um potencial alvo para o diagnóstico da LVC (Siqueira, 2018). Apesar do bom desempenho diagnóstico do rKDDR-PLUS em testes laboratoriais, há a necessidade da avaliação deste método diagnóstico em áreas endêmicas para a leishmaniose. Assim, o correto diagnóstico para a LV será importante para compreendermos a epidemiologia da doença na região. Além disso, a acurácia no diagnóstico evitaria a eutanásia de cães erroneamente diagnosticados pelos métodos atuais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar o antígeno rKDDR-Plus para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina em cães mantidos em abrigos de Aracaju/SE.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a reatividade cruzada entre leishmaniose visceral canina e babesiose em testes diagnósticos sorológicos – ELISA, DPP Bio-Manguinhos e Teste imunocromatográfico rKDDR-Plus.
- Avaliar a performance do antígeno rKDDR PLUS em relação a outro método diagnóstico disponível no mercado.
- Avaliar as manifestações clínicas associadas a leishmaniose visceral canina em cães mantidos em abrigos de Aracaju/SE.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

O estudo possui caráter experimental transversal, com coleta que ocorreu apenas em momento pontual.

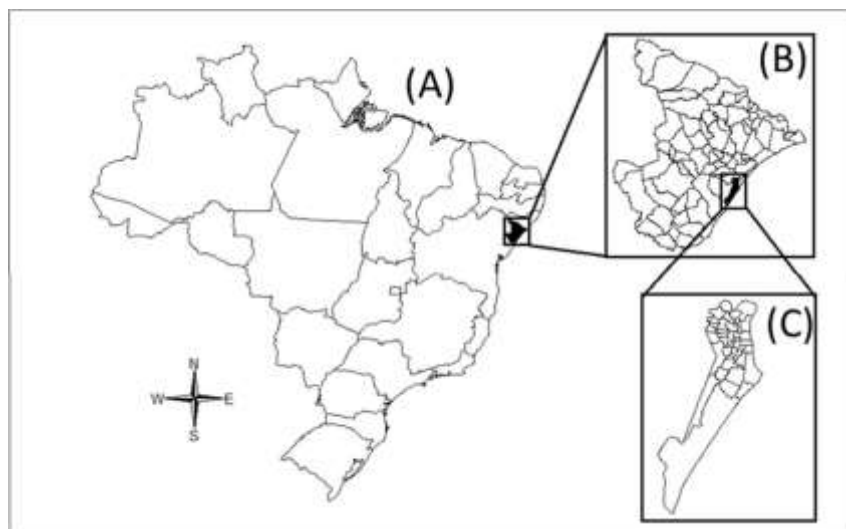
3.2. Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe – UFS, conforme protocolo nº 05/2019. (ANEXO 1).

3.3. Área de estudo

O estado de Sergipe está localizado na região nordeste do Brasil e é o menor estado do país possuindo 21.962,10 km². Sua capital Aracaju possui 181,857 km² e uma população estimada em 657.013 habitantes em 2019 (IBGE, 2020). Aracaju é dividida em 39 bairros, possui clima quente úmido, temperatura média de 26 °C, precipitação anual de 1.590 mm e com estação chuvas entre março e agosto (**FIGURA 2**). O município de Aracaju apresentou entre os anos de 2014 e 2018 média de 25,8 casos positivos para LVH, sendo classificada como área com transmissão intensa e, de acordo com inqueritos caninos realizados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Aracaju, em 2018 17,38% (318/1830) dos cães avaliados, foram diagnosticados como positivos pa LV. Considerando a importância do reservatório canino na manutenção e transmissão da doença, existe a necessidade da obtenção de métodos diagnósticos confiáveis para LV (Campos *et al.*, 2017).

Figura 2 – A) Mapa do Brasil com destaque para a região Nordeste. B) Mapa do estado de Sergipe; C) Mapa do município de Aracaju



Fonte: Adaptado de IBGE, 2017.

3.4. Instalações

Fizeram parte deste estudo dois abrigos de animais, ambos localizados no bairro Santa Maria, situado na zona de expansão de Aracaju. Os abrigos são abertos, os cães são separados em setores por capacidade de convivência entre os mesmos, não existe asfaltamento nas ruas onde residem, todos os cães são alimentando duas vezes por dia, água é disponibilizada em vários pontos, os cães machos são em sua maioria castrados (os que não são estão aguardando castração) e a limpeza das áreas é realizada todos os dias pelas manhãs. Cães que possuem alguma doença altamente contagiosa como cinomose ou alguma debilidade como paralisia são agrupados em áreas separadas. Cães diagnosticados para LV são mantidos no abrigos, não é realizada a eutanásia dos mesmos. Filhotes recém nascidos e cães em tratamento são colocados em canis individuais (**FIGURA 3**). De acordo com a contagem anterior ao início das coletas, foram contabilizados nos dois abrigos o total de 400 cães.

Figura 3 – Instalações dos abrigos; diferentes setores onde os cães permanecem



Fonte: Amado-Gomes, 2019.

3.5. Cálculo amostral

O número de animais foi estipulado utilizando a fórmula para cálculo do tamanho de amostras para descrição de variáveis qualitativas em uma população finita, onde n representa o tamanho da amostra; $Z_{\alpha/2}$ o valor crítico para o grau de confiança desejado, usualmente: 1,96 (95%); E o erro padrão, usualmente: $\pm 5\%$ da proporção dos casos (precisão absoluta), N o tamanho da população (finita); p a proporção de resultados favoráveis da variável na população; q a proporção de resultados desfavoráveis na população ($q=1-p$) (Miot, 2011).

$$n = \frac{N \cdot p \cdot q \cdot (Z_{\alpha/2})^2}{(N - 1) \cdot (E)^2 + p \cdot q \cdot (Z_{\alpha/2})^2}$$

Com $N = 400$ (número do total de cães nos dois abrigos), margem de erro de 5%, nível de significância de 5% e considerando um percentual de 85,29% de cães positivos na PCR

(Pessoa e Silva *et al.*, 2019), o tamanho mínimo da amostra foi de 131 cães. A amostra deste estudo foi composta por 154 cães sem raça definida (SRD) residentes de dois abrigos de animais de Aracaju.

As coletas foram realizadas após a apresentação do projeto, esclarecimento de possíveis dúvidas e assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) pelo responsável pelo abrigo (ANEXO II).

3.6. Seleção e contenção dos cães

Com a finalidade de tornar a seleção dos cães aleatória, primeiramente foi feito um levantamento das cores dos cães dos abrigos (preto, branco, amarelo, preto e branco, pintado, pequeno ou aparentemente novo, velho, marrom ou castanho e sem cor determinada). Posteriormente, a uma funcionária do abrigo, que não sabia do que se tratava o estudo, foi designada a função de escolher aleatoriamente um cão a partir da cor que estava listada, alternando entre machos e fêmeas. Os cães eram conduzidos, através de uma coleira, ao local da coleta e avaliação clínica. Foi utilizada como contenção, para retirar os cães do chão e colocá-los na mesa de coleta, uma corda para prevenção de mordidas (FIGURA 4).

Figura 4 – Corda utilizada como contenção para prevenção de mordidas dos cães



Fonte: Amado-Gomes, 2019.

3.7. Avaliação clínica dos animais

Todo cão participante da coleta foi identificado através de uma numeração inserida em sua ficha de avaliação e nos tubos da coleta sanguínea. Em seguida foi fotografado e avaliado clinicamente por uma bióloga que buscou sinais e sintomas potencialmente relacionados à leishmaniose visceral canina e os cães foram discriminados como machos ou fêmeas

(**APÊNDICE 1**). Não foi possível discriminar a idade dos cães, tendo em vista que 90% dos cães avaliados foram regatados adultos, inviabilizando assim determinar com precisão, a partir de características físicas (dentição) a idade do animal. Finalizada a avaliação clínica do cão, foi realizada a coleta sanguínea e um barbante amarrado em volta do pescoço de cada animal foi utilizado como ferramenta de marcação, a fim de evitar coletas sanguíneas repetidas no mesmo cão (**FIGURA 5**).

Figura 5 – Barbante amarrado utilizado como ferramenta de marcação



Fonte: Amado-Gomes, 2019.

3.8. Coleta sanguínea

Foram coletados 8 ml de sangue por animal da veia safena do membro posterior ou da veia cefálica do membro dianteiro. O sangue coletado foi distribuído em dois tubos de coleta (4 ml em cada tubo), um contendo EDTA como anticoagulante e outro sem anticoagulante para a separação do soro. O sangue armazenado nos tubos de EDTA foi pipetado e aliqotado em ependorffs de 2 ml e o sangue contido nos tubos sem anticoagulante foi centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos, o soro decorrente da centrifugação foi pipetado e aliqotado em ependorffs de 2 ml. Posteriormente todas as amostras foram armazenadas a - 80°C.

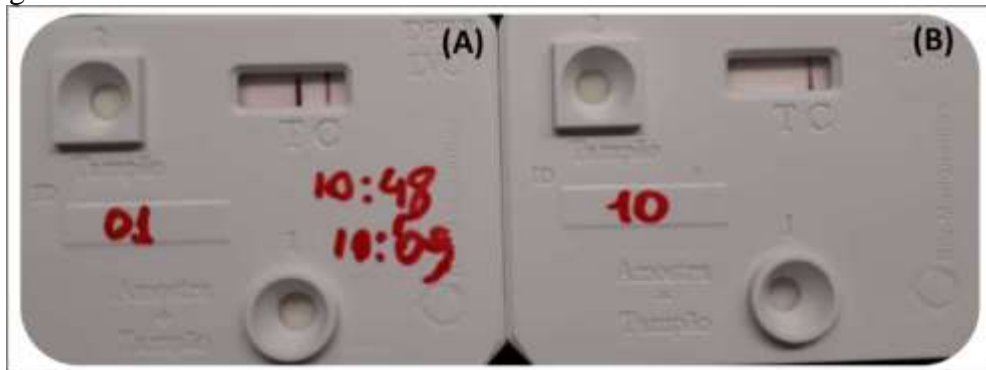
3.9. Triagem sorológica por testes rápidos

3.9.1. Teste imunocromatográfico DPP Bio-Manguinhos®

O teste DPP Bio-Manguinhos® (FIOCURUZ, Brasil) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, o teste DPP® foi realizado pela adição de 5 µL do soro ao poço 1 intitulado “Amostra + Tampão”, a seguir foram adicionadas duas gotas do tampão. Após cinco minutos as duas linhas azuis, controle (C) e teste (T), desapareceram. Em seguida foram colocadas quatro gotas do tampão no poço 2 intitulado “Tampão”. A leitura dos

resultados foi realizada 10 minutos após esta etapa, sendo visualizadas as seguintes condições: aparecimento (**Figura 6a**) de duas linhas vermelhas – resultado positivo; (**Figura 6b**) de uma linha vermelha – resultado negativo.

Figura 6 – Exemplo de resultado do teste de Imunocromatografia de dupla migração DPP Bio-Manguinhos®



Fonte: Amado-Gomes, 2019.

3.9.2. Teste imunocromatográfico rKDDR-PLUS

O teste imunocromatográfico rKDDR-Plus (Safetest® Diagnósticos, Brasil) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 20µL da amostra de soro foi aplicado no cassete de amostra, posteriormente uma gota do tampão de corrida foi adicionado. O resultado foi visualizado após 15 minutos de incubação. Após esta etapa, foram visualizadas as seguintes condições: aparecimento (**Figura 7a**) duas linhas vermelhas – resultado positivo ; (**Figura 7b**) de uma linha vermelha – resultado negativo.

Figura 7– Exemplo de resultado do teste de Imunocromatografia de fluxo lateral rKDDR-Plus®



Fonte: Amado-Gomes, 2019.

3.10. Padronização de ELISA

Foi utilizado o protocolo de três dias para realização das ELISA's e cada amostra foi

pipetada em duplicata. No primeiro dia, cada orifício da placa de microtitulação de 96 poços (Costar, Cambridge, MA, USA) foi sensibilizado com antígeno (rKDDR 100 ng, rKDDR-Plus 100 ng ou antígeno bruto de *L. infantum*). Foi utilizado 1 micrograma de antígeno – diluído em 100 µl de tampão carbonato ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3 + \text{H}_2\text{O}$ destilada). Incubado overnight, por pelo menos 12 horas na temperatura de 4°C. No segundo dia, a placa foi lavada 3 vezes com 200 µl de solução de lavagem (PBS-0,05% Tween 20) e, posteriormente, 200 µl de solução de bloqueio de sítios inespecíficos (PBS-0,5 % + BSA 1%) foi adicionada a placa. Após incubação por 60 minutos em temperatura ambiente (25°C) a placa foi vertida para descarte. Foram aplicados 100 µl dos soros dos cães diluídos 1:100 em PBS-0,5 % + BSA 1% em cada orifício e em seguida foram incubados overnight, por pelo menos 12 horas na temperatura de 4°C. Nos últimos poços de cada placa foram colocados os controles (2 amostras positivas, 3 negativas e 2 brancos). No terceiro e último dia, cada placa foi lavada cinco vezes com 200 µl de solução de lavagem (PBS-0,05% Tween 20), o conjugado Anti-Dog IgG - Peroxidase produzida em coelho (Sigma – HPR A6792) foi diluído em 1:2500 em BSA 1% Tween 20, logo após foi aplicado 100 µl do conjugado diluído em cada orifício da placa e incubado por 60 minutos em temperatura ambiente. Cada placa foi lavada cinco vezes com 200 µl de solução de lavagem (PBS-0,05% Tween 20), foi adicionado a cada poço 100 µl da solução reveladora contendo ácido cítrico 0,1 M, Na_2PO_4 0,2 M, OPD 0,05% e H_2O_2 0,1%. Após incubação por 20 minutos em temperatura ambiente e em local escuro, foi interrompida a reação com 25 µl de H_2SO_4 (2N) e realizada a leitura usando o comprimento de onda de 492 nm.

Para cada placa o ponto de corte (*cut-off*) foi determinado a partir da média das leituras de absorbância dos seis soros negativos, mais duas vezes o desvio padrão. A média da absorbância dos soros testados foi dividido pelo valor de *cut-off* encontrado em cada placa, com o objetivo de determinar o índice de reatividade (IR), normalizando assim os valores de densidade óptica (OD). Os soros que apresentaram valor de $\text{IR} > 1,0$ foram considerados positivos e $\text{IR} < 1,0$ foram considerados negativos. As reações foram lidas em leitor de ELISA (Modelo: Synergy Mx 267101) a 492 nm e os resultados expressos em valores de absorbância.

3.11. Diagnóstico molecular

3.11.1. Extração de DNA das amostras de sangue total

A extração de DNA de amostras de sangue total dos animais foi realizada utilizando o protocolo de guanidina, segundo Pitcher e cols. (1989), com pequenas modificações. Amostras de sangue total foram diluídas em reagente de GES (60 g/L Tiocianato de Guanidina, 0,5 de EDTA, pH 8,0). Foi realizada centrifugação por 10 minutos a 1844 giros por minuto e ao

sobrenadante foi adicionado isopropanol (2-propanol) a -20°C . Os tubos foram acondicionados por 10 minutos a -20°C , após esse período foram invertidos, homogeneizados e centrifugados 1844 giros por minuto, por 5 minutos para precipitar o DNA. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol 70% a temperatura ambiente. Em seguida o sedimento foi suspenso, uma centrifugação de 5 minutos a 1590 giros por minuto foi feita, os tubos foram secados invertidos. O sedimento foi então suspenso e diluído em 30 μL de água Milli-Q e armazenado a -20°C .

3.11.2. PCR para diagnóstico de *Leishmania sp.*

A análise das amostras de sangue foi realizada conforme Lachaud e cols. (2002). Resumidamente, foi utilizado 19 μL de supermix (Invitrogen, Brasil), 4 μL de DNA (aproximadamente 200 ng) e 1 μL de cada iniciador (Forward: 5' CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 3', Reverse: 5' CCACCTGGCCTATTTTACACCA 3', 10 μM), totalizando um volume de 25 μL . As condições de PCR consistiram de uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação de 94°C por 30 segundos, anelamento de 59°C por 30 segundos, e extensão de 72°C por 30 segundos, seguido de uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Brasil) a 2%, em tampão de corrida Tris-Borato EDTA (TBE - 50 mM de Tris, 50 mM de ácido bórico, 2,5 mM de EDTA, pH 8,0), corado com SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen, Brasil) e examinado em transiluminador de luz ultravioleta. As bandas foram comparadas com o padrão de tamanho molecular plus DNA ladder (Invitrogen, Brasil) de 145 pb. Controles positivos e negativos foram utilizados como controle interno de reação.

3.11.3. PCR para diagnóstico de *Babesia spp.*

Com a finalidade de verificar reatividade cruzada, foi realizada PCR para o diagnóstico de babesiose. A análise das amostras de sangue foi realizada conforme Carret e cols. (1999) com pequenas modificações. Resumidamente, foram utilizados 17 μL supermix (Invitrogen, Brasil), 1 μL de DNA (Aproximadamente 50 ng) e 1 μL de cada iniciador (Forward: 5' - AATACCCAATCCTGACACAGGG - 3', Reverse: 5' - TTAAATACGAATGCCCCCAAC - 3', 10 μM), em volume total de 20 μL . As condições de PCR consistiram de uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação de 95°C por 45 segundos, anelamento de 55°C por 45 segundos, e extensão de 72°C por 45 segundos, seguido de uma extensão final

de 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Brasil) a 2%, em tampão de corrida Tris-Borato EDTA (TBE - 50 mM de Tris, 50 mM de ácido bórico, 2,5 mM de EDTA, pH 8,0), corado com SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen, Brasil) e examinado em um transiluminador de luz ultravioleta. As bandas foram comparadas com o padrão de tamanho molecular plus DNA ladder (Invitrogen, Brasil) de 400 pb. Controles positivos e negativos foram utilizados como controle interno de reação.

3.11.4. PCR quantitativa (qPCR) para determinação da carga parasitária

Para quantificar a carga parasitária dos animais positivos na PCR convencional, foi preparado um mix contendo 5 µL de Sybr (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix), 1 µL de Primer *L. infantum* DNA polimerase (Forward: 5' TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG 3', Reverse: 5' GCA TCG CAG GTG TGA GCA C 3', 10 µM) e 4 µL de água ultrapura estéril. As reações foram distribuídas em placas (Applied Biosystems N8010560 Microamp Optical 96 well). Cada poço recebeu o volume final de 10 µL, sendo 9 µL do mix acrescido de 1 µL de DNA (20 ng/µL), a placa foi então selada utilizando MicroAmp™ Optical Adhesive Film e centrifugada a 300 giros por cinco minutos na temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram colocadas no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Systems, EUA), As condições da qPCR consistiram de uma desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão de 60°C por 1 minuto. A análise da qPCR foi realizada pelo 7500 software versão 2.0.1 (Thermo Fisher, EUA) e os resultados foram determinados segundo o método de curva padrão que foram constituídos a partir da diluição seriada de DNA extraído de 10⁶ promastigotas de *L. infantum*.

3.12. Análise estatística

Para a determinar a normalidade da amostra foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. A distribuição dos sintomas e diagnósticos foi analisada por meio de tabelas de contingência a 5% de significância pelo teste de Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher. Posteriormente, foi utilizado o modelo de regressão logística binária e calculadas odds ratio (OR) para a presença de sinais clínicos. A curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foi utilizada para estabelecer o limite inferior de positividade (*cut-off*) para as ELISAS rKDDR, rKDDR-Plus e Extrato Bruto de *L. infantum* para determinar o maior valor combinado de sensibilidade, especificidade e área sob a curva. Conforme descrito previamente (Linnet *et al.*, 2012), o desempenho de cada teste foi avaliado de acordo com a sensibilidade, especificidade, o valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), a área sob a curva (AUC) e

acurácia (AC). O grau de concordância entre os testes de triagem, ELISA e a PCR foi determinado pelo índice Kappa (k) e os valores com intervalos de confiança de 95% interpretados de acordo com a seguinte escala de Fleiss: 0,00-0,20, pobres; 0,21-0,40, justo; 0,41-0,60, moderada; 0,61-0,80, boa; 0,81-0,99, muito bom e 1,00, perfeito (Fleiss *et al.*, 1972). Para a análise estatística dos dados gerados neste trabalho foi utilizado o GraphPad Prism 8 (GraphPad Inc, EUA), o Microsoft Excel (2019) e o IBM Spss Statistic (versão 23).

4. MANUSCRITO A SER SUBMETIDO

Título do Artigo: Avaliação do antígeno rKDDR-Plus para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina em abrigos de animais de Aracaju, Sergipe, nordeste do Brasil, em preparação para submissão na revista Plos One. Fator de Impacto: 2.776.

Ana Carolina Amado Gomes¹; Silvio Santana Dolabella²; Ricardo Toshio Fujiwara²

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão/SE, Brasil.

²Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão/SE, Brasil.

³Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, Brasil.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença tropical negligenciada que pode levar a morte caso não seja diagnosticada e tratada corretamente. O cão doméstico é considerado o reservatório mais importante devido a sua proximidade com o homem. O diagnóstico correto do reservatório canino é de suma importância para controlar a transmissão da doença. A fim de aprimorar o diagnóstico da LV canina, foi desenvolvido um antígeno recombinante constituído por 15,3 motivos repetitivos e 39 aminoácidos da kinesina denominado rKDDR-Plus. O objetivo deste estudo foi avaliar o antígeno rKDDR-Plus para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina em cães mantidos em abrigos de Aracaju/SE. Foi utilizada como padrão ouro, a PCR para *Leishmania* sp. O teste imunocromatográfico de rKDDR-Plus mostrou maior sensibilidade (57%); comparado ao DPP Bio-Manguinhos® (45%). Ambos os testes obtiveram a mesma especificidade (69%). O rKDDR-Plus apresentou maior acurácia em diagnosticar cães para LV em área endêmica quando comparado ao teste rápido utilizado atualmente na realização na triagem A ELISA rKDDR apresentou maior sensibilidade, 49% com IC de 95%: 40.71-57.78; já a ELISA rKDDR-Plus apresentou maior especificidade, 81% com IC de 95%: 62.12-91.49. Quando comparada com os outros dois testes, o rKDDR-Plus apresentou a maior área da curva ROC, seguida por Extrato Bruto e rKDDR. Conclui-se que o rKDDR-Plus pode ser utilizado como ferramenta para diagnosticar a LVC.

Palavras-chaves: Kala-azar; *Leishmania infantum*; Sorologia; Proteína recombinante.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* [1]. A Leishmaniose Visceral (LV) ou popularmente conhecida como kala-azar (calazar), é considerada a forma mais grave da doença, pois pode levar a morte caso não seja corretamente diagnosticada e tratada. Causada por *Leishmania infantum* no Novo Mundo e *Leishmania donovani* no Velho Mundo, ambas pertencem ao complexo *Leishmania donovani* [2], contudo já foi sugerido que a LV pode ser causada por outras espécies, como *Leishmania* [3].

No Brasil, a LV possui caráter zoonótico, seu agente etiológico é a *Leishmania infantum* e o cão doméstico é considerado o principal reservatório da doença. A proximidade entre cão e homem eleva as chances de dispersão da doença, pois os casos de leishmaniose visceral humana (LVH) são precedidos por casos de leishmaniose visceral canina (LVC), evidenciando a importância do cão para a transmissão da doença e a manutenção do ciclo urbano (4, 5).

A medida de controle recomendada para cães positivos é a eutanásia; porém, estudos mostram que essa medida possui impacto limitado. Durante quatro anos, mais de 80 mil cães sofreram eutanásia no Brasil, mas a incidência da doença humana aumentou mais de 100%. A baixa sensibilidade e especificidade, a reatividade cruzada dos testes sorológicos, a pequena adesão dos donos em realizar a eutanásia seus cães soropositivos e a rápida substituição dos cães sacrificados por filhotes suscetíveis, podem ser motivos responsáveis pelo fracasso dessa estratégia de controle [6].

Recentemente, uma série de antígenos recombinantes tem sido testados e caracterizados a fim de melhorar o diagnóstico da LVC, com destaque para os antígenos rK39, rK9, rK26 e rK28, derivados da kinesina de *L. infantum* e rKRP42, rKE16 e rKLO8 de *L. donovani* [7]. Kinesinas são proteínas motoras que exercem importante papel de regular processos mitóticos e o comprimento do flagelo nas espécies de *Leishmania*. A proteína recombinante K39 possui alta antigenicidade relacionada a motivos repetidos de longa duração de sequências de aminoácidos de kinesina. Porém, apesar da sua utilização contínua, seu desempenho em diagnosticar a doença não se mostrou eficaz [8].

Denominado rKDDR, um antígeno recombinante com 8,5 motivos repetidos da proteína kinesina, além de 19 aminoácidos da porção não repetitiva desta mesma proteína, gerou melhoria no teste diagnóstico para a LVC [9]. A fim de alcançar um resultado superior para o diagnóstico da LVC, foi desenvolvido outro antígeno recombinante constituído por 15,3 motivos repetitivos e 39 aminoácidos da kinesina denominado rKDDR-Plus. Acredita-se que quanto maior a quantidade de motivos repetitivos em uma proteína de kinesina, maior sua

capacidade antigênica, tornando-a um potencial alvo para o diagnóstico da LVC (Siqueira, 2018). No presente estudo avaliamos o antígeno rKDDR-Plus para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina em cães mantidos em abrigos do município de Aracaju, Sergipe, nordeste do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estado de Sergipe está localizado na região nordeste do Brasil e é o menor estado do país possuindo 21.962,10 km². Sua capital Aracaju possui 181,857 km², população estimada em 657.013 habitantes em 2019 e é dividida em 39 bairros. Possui clima quente úmido, temperatura média de 26 °C, precipitação anual de 1.590 mm e com estação chuvas entre março e agosto. O município de Aracaju apresentou entre os anos de 2014 e 2018 média de 25,8 casos positivos para LVH, sendo classificada como área com transmissão intensa [27] e, de acordo com inqueritos caninos realizados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Aracaju, em 2018 17,38% (318/1830) dos cães avaliados, foram diagnosticados como positivos pa LV [28] Considerando a importância do reservatório canino na manutenção e transmissão da doença, existe a necessidade da obtenção de métodos diagnósticos confiáveis para LV.

Instalações

Fizeram parte deste estudo dois abrigos de animais, ambos localizados no bairro Santa Maria, situado na zona de expansão de Aracaju. Os abrigos são abertos, os cães são separados em setores por capacidade de convivência entre os mesmos, não existe asfaltamento nas ruas onde residem, todos os cães são alimentando duas vezes por dia, água é disponibilizada em vários pontos, os cães machos são em sua maioria castrados (os que não são estão aguardando castração) e a limpeza das áreas é realizada todos os dias pelas manhãs. Cães que possuem alguma doença altamente contagiosa como cinomose ou alguma debilidade como paralisia são agrupados em áreas separadas. Cães diagnosticados para LV são mantidos no abrigos, não é realizada a eutanásia dos mesmos. Filhotes recém nascidos e cães em tratamento são colocados em canis individuais (**FIGURA 3**). De acordo com a contagem anterior ao início das coletas, foram contabilizados nos dois abrigos o total de 400 cães.

Cálculo Amostral

O número de animais foi estipulado utilizando a fórmula para cálculo do tamanho de amostras para descrição de variáveis qualitativas em uma população finita, onde n representa o

tamanho da amostra; $Z_{\alpha/2}$ o valor crítico para o grau de confiança desejado, usualmente: 1,96 (95%); E o erro padrão, usualmente: $\pm 5\%$ da proporção dos casos (precisão absoluta), N o tamanho da população (finita); p a proporção de resultados favoráveis da variável na população; q a proporção de resultados desfavoráveis na população ($q=1-p$) [10].

$$n = \frac{N \cdot p \cdot q \cdot (Z_{\alpha/2})^2}{(N - 1) \cdot (E)^2 + p \cdot q \cdot (Z_{\alpha/2})^2}$$

Com $N = 400$ (número do total de cães nos dois abrigos), margem de erro de 5%, nível de significância de 5% e considerando um percentual de 85,29% de cães positivos na PCR [11], o tamanho da amostra mínima foi de 131 cães. A amostra deste estudo foi composta por 154 cães sem raça definida (SRD) residentes de dois abrigos de animais de Aracaju.

Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe – UFS, conforme protocolo nº 05/2019.

Seleção e Avaliação clínica dos Animais

Os cães foram selecionados aleatoriamente e conduzidos, através de uma coleira, ao local da coleta e avaliação clínica. Todo cão participante da coleta foi identificado, fotografado e avaliado clinicamente (**APÊNDICE 1**). Não foi possível discriminar a idade dos cães, tendo em vista que 90% os cães avaliados foram regatados das ruas já adultos. Após a avaliação clínica e identificação do cão, foi realizada a coleta sanguínea para realização dos testes diagnósticos.

Coleta sanguínea

Foram coletados 8 ml de sangue por animal da veia safena do membro posterior ou da veia cefálica do membro dianteiro. O sangue coletado foi distribuído em dois tubos de coleta (4 ml em cada tubo), um contendo EDTA como anticoagulante e outro sem anticoagulante para a separação do soro. O sangue armazenado nos tubos de EDTA foi pipetado e aliqüotado em ependorffs de 2 ml e o sangue contido nos tubos sem anticoagulante foi centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos, o soro decorrente da centrifugação foi pipetado e aliqüotado em ependorffs de 2 ml. Posteriormente todas as amostras foram armazenadas a -80°C .

Triagem sorológica por testes rápidos

Teste imunocromatográfico DPP Bio-Manguinhos®

O teste DPP Bio-Manguinhos® (FIOCURUZ, Brasil) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, o teste DPP® foi realizado pela adição de 5 µL do soro ao poço 1 intitulado “Amostra + Tampão”, a seguir foram adicionadas duas gotas do tampão. Após cinco minutos as duas linhas azuis, controle (C) e teste (T), desapareceram. Em seguida foram colocadas quatro gotas do tampão no poço 2 intitulado “Tampão”. A leitura dos resultados foi realizada 10 minutos após esta etapa, sendo visualizadas as seguintes condições: aparecimento de duas linhas vermelhas – resultado positivo; aparecimento de uma linha vermelha – resultado negativo.

Teste imunocromatográfico rKDDR-PLUS

O teste imunocromatográfico rKDDR-Plus (Safetest® Diagnósticos, Brasil) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 20µL da amostra de soro foi aplicado no cassete de amostra, posteriormente uma gota do tampão de corrida foi adicionado. O resultado foi visualizado após 15 minutos de incubação. Após esta etapa, foram visualizadas as seguintes condições: aparecimento de duas linhas vermelhas – resultado positivo ; aparecimento de uma linha vermelha – resultado negativo.

Padronização de ELISA

Foi utilizado o protocolo de três dias para realização das ELISA's e cada amostra foi pipetada em duplicata. No primeiro dia, cada orifício da placa de microtitulação de 96 poços (Costar, Cambridge, MA, USA) foi sensibilizado com antígeno (rKDDR 100 ng, rKDDR-Plus 100 ng ou antígeno bruto de *L. infantum*). Foi utilizado 1 micrograma de antígeno – diluído em 100 µl de tampão carbonato ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3 + \text{H}_2\text{O}$ destilada). Incubado overnight, por pelo menos 12 horas na temperatura de 4°C. No segundo dia, a placa foi lavada 3 vezes com 200 µl de solução de lavagem (PBS-0,05% Tween 20) e, posteriormente, 200 µl de solução de bloqueio de sítios inespecíficos (PBS-0,5 % + BSA 1%) foi adicionada a placa. Após incubação por 60 minutos em temperatura ambiente (25°C) a placa foi vertida para descarte. Foram aplicados 100 µl dos soros dos cães diluídos 1:100 em PBS-0,5 % + BSA 1% em cada orifício e em seguida foram incubados overnight, por pelo menos 12 horas na temperatura de 4°C. Nos últimos poços de cada placa foram colocados os controles (2 amostras positivas, 3 negativas e 2 brancos). No terceiro e último dia, cada placa foi lavada cinco vezes com 200 µl de solução de lavagem (PBS-0,05% Tween 20), o conjugado Anti-Dog IgG - Peroxidase produzida em coelho (Sigma – HPR A6792) foi diluído em 1:2500 em BSA 1% Tween 20, logo após foi

aplicado 100 µl do conjugado diluído em cada orifício da placa e incubado por 60 minutos em temperatura ambiente. Cada placa foi lavada cinco vezes com 200 µl de solução de lavagem (PBS-0,05% Tween 20), foi adicionado a cada poço 100 µl da solução reveladora contendo ácido cítrico 0,1 M, Na₂PO₄ 0,2 M, OPD 0,05% e H₂O₂ 0,1%. Após incubação por 20 minutos em temperatura ambiente e em local escuro, foi interrompida a reação com 25 µl de H₂SO₄ (2N) e realizada a leitura usando o comprimento de onda de 492 nm.

Para cada placa o ponto de corte (*cut-off*) foi determinado a partir da média das leituras de absorvância dos seis soros negativos, mais duas vezes o desvio padrão. A média da absorvância dos soros testados foi dividido pelo valor de *cut-off* encontrado em cada placa, com o objetivo de determinar o índice de reatividade (IR), normalizando assim os valores de densidade óptica (OD). Os soros que apresentaram valor de IR>1,0 foram considerados positivos e IR<1,0 foram considerados negativos. As reações foram lidas em leitor de ELISA (Modelo: Synergy Mx 267101) a 492 nm e os resultados expressos em valores de absorvância.

Diagnóstico molecular

Extração de DNA das amostras de sangue total

A extração de DNA de amostras de sangue total dos animais foi realizada utilizando o protocolo de guanidina, segundo [12], com pequenas modificações. Amostras de sangue total foram diluídas em reagente de GES (60 g/L Tiocianato de Guanidina, 0,5 de EDTA, pH 8,0). Foi realizada centrifugação por 10 minutos a 1844 giros por minuto e ao sobrenadante foi adicionado isopropanol (2-propanol) a -20°C. Os tubos foram acondicionados por 10 minutos a -20°C, após esse período foram invertidos, homogeneizados e centrifugados 1844 giros por minuto, por 5 minutos para precipitar o DNA. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol 70% a temperatura ambiente. Em seguida o sedimento foi suspenso, uma centrifugação de 5 minutos a 1590 giros por minuto foi feita, os tubos foram secados invertidos. O sedimento foi então suspenso e diluído em 30 µL de água Milli-Q e armazenado a -20°C.

PCR para diagnóstico de *Leishmania sp.*

A análise das amostras de sangue foi realizada conforme [13]. Resumidamente, foi utilizado 19 µL de supermix (Invitrogen, Brasil), 4 µL de DNA (aproximadamente 200 ng) e 1 µL de cada iniciador (Forward:5' CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 3', Reverse: 5' CCACCTGGCCTATTTTACACCA 3', 10 µM), totalizando um volume de 25 µL. As condições de PCR consistiram de uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação de 94°C por 30 segundos, anelamento de 59°C por 30 segundos, e extensão de

72°C por 30 segundos, seguido de uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Brasil) a 2%, em tampão de corrida Tris-Borato EDTA (TBE - 50 mM de Tris, 50 mM de ácido bórico, 2,5 mM de EDTA, pH 8,0), corado com SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen, Brasil) e examinado em transiluminador de luz ultravioleta. As bandas foram comparadas com o padrão de tamanho molecular plus DNA ladder (Invitrogen, Brasil) de 145 pb. Controles positivos e negativos foram utilizados como controle interno de reação.

PCR para diagnóstico de *Babesia spp.*

Com a finalidade de verificar reatividade cruzada, foi realizada PCR para o diagnóstico de babesiose. A análise das amostras de sangue foi realizada conforme [14] com pequenas modificações. Resumidamente, foram utilizados 17 µL supermix (Invitrogen, Brasil), 1 µL de DNA (Aproximadamente 50 ng) e 1 µL de cada iniciador (Forward: 5' - AATACCCAATCCTGACACAGGG - 3', Reverse: 5' - TTAAATACGAATGCCCCCAAC - 3', 10 µM), em volume total de 20 µL. As condições de PCR consistiram de uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação de 95°C por 45 segundos, anelamento de 55°C por 45 segundos, e extensão de 72°C por 45 segundos, seguido de uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Brasil) a 2%, em tampão de corrida Tris-Borato EDTA (TBE - 50 mM de Tris, 50 mM de ácido bórico, 2,5 mM de EDTA, pH 8,0), corado com SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen, Brasil) e examinado em um transiluminador de luz ultravioleta. As bandas foram comparadas com o padrão de tamanho molecular plus DNA ladder (Invitrogen, Brasil) de 400 pb. Controles positivos e negativos foram utilizados como controle interno de reação.

PCR quantitativa (qPCR) para determinação da carga parasitária

Para quantificar a carga parasitária dos animais positivos na PCR convencional, foi preparado um mix contendo 5 µL de Sybr (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix), 1 µL de Primer *L. infantum* DNA polimerase (Forward: 5' TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG 3', Reverse: 5' GCA TCG CAG GTG TGA GCA C 3', 10 µM) e 4 µL de água ultrapura estéril. As reações foram distribuídas em placas (Applied Biosystems N8010560 Microamp Optical 96 well). Cada poço recebeu o volume final de 10 µL, sendo 9 µL do mix acrescido de 1 µL de DNA (20 ng/µL), a placa foi então selada utilizando MicroAmp™ Optical Adhesive Film e centrifugada a 300 giros por cinco minutos na temperatura ambiente. Posteriormente, as placas

foram colocadas no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Systems, EUA), As condições da qPCR consistiram de uma desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão de 60°C por 1 minuto. A análise da qPCR foi realizada pelo 7500 software versão 2.0.1 (Thermo Fisher, EUA) e os resultados foram determinados segundo o método de curva padrão que foram constituídos a partir da diluição seriada de DNA extraído de 10⁶ promastigotas de *L. infantum*.

Análise estatística

Para a determinação da normalidade da amostra foi realizado um teste de Kolmogorov-Smirnov. A distribuição dos sintomas e diagnósticos foi analisada por meio de tabelas de contingência a 5% de significância pelo teste de Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher. Posteriormente, foi utilizado o modelo de regressão logística binária e calculadas odds ratio (OR) para a presença de sinais clínicos. A curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foi utilizada para estabelecer o limite inferior de positividade (*cut-off*) para as ELISAS rKDDR, rKDDR-Plus e Extrato Bruto *L. infantum* para determinar o maior valor combinado de sensibilidade, especificidade e área sob a curva. Conforme descrito previamente [15], o desempenho de cada teste foi avaliado de acordo com a sensibilidade, especificidade, o valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), a área sob a curva (AUC) e acurácia (AC). O grau de concordância entre os testes de triagem, ELISA e a PCR foi determinado pelo índice Kappa (k) e os valores com intervalos de confiança de 95% interpretados de acordo com a seguinte escala de Fleiss: 0,00-0,20, pobres; 0,21-0,40, justo; 0,41-0,60, moderada; 0,61-0,80, boa; 0,81-0,99, muito bom e 1,00, perfeito [16]. Para a análise estatística dos dados gerados neste trabalho foi utilizado o GraphPad Prism 8 (GraphPad Inc, EUA), o Microsoft Excel (2019) e o IBM Spss Statistic (versão 23).

RESULTADOS

Validação do teste imunocromatográfico (TIC) rKDDR-Plus no diagnóstico da LVC

Foram coletadas e analisadas 154 amostras de cães, não houve perda amostral. A PCR, método padrão ouro deste estudo, considerou 83.11% (128/154) dos cães positivos e 16.88% (26/128) dos cães negativos. Os resultados obtidos através dos testes rápidos rKDDR-Plus e DPP Bio-Manguinhos®, disponível no mercado (FIOCRUZ-Bio-Manguinhos, Brasil), foram comparados com os resultados da PCR (**TABELA 1**). O teste rápido rKDDR-Plus mostrou sensibilidade de 57% e o DPP Bio-Manguinhos® apresentou sensibilidade de 45%. Ambos os testes obtiveram a mesma especificidade de 69%. Ao avaliar a associação (casualidade) entre

os resultados dos testes imunocromatográficos e os da PCR, os testes rKDDR-Plus e DPPBio-Manguinhos® obtiveram $p = 0.01$ e $p = 0.20$, respectivamente.

Desempenho dos antígeno rKDDR, rKDDR-PLUS E EXTRATO BRUTO de *L. infantum* no diagnóstico de LVC

A validação dos antígenos rKDDR, rKDDR-PLUS e Extrato Bruto de *L. infantum* para o diagnóstico sorológico da LVC foi realizada utilizando ELISA. Foi utilizada como padrão ouro, para determinar a veracidade dos resultados obtidos pelo ELISA, a PCR para *Leishmania* sp. Foi utilizado o valor de Índice de Reatividade (IR) para normalizar os valores de *cut-off* encontrado nas ELISAS. Considerando como positivo todos os valores $IR > 1,0$. Os dados referentes à reatividade e performance da rKDDR, rKDDR-PLUS e Extrato Bruto de *L. infantum* estão representados na figura 8 e 9. As tabelas 2 e 3 apresentam os dados de performance e concordância, respectivamente. Não foi identificada reatividade cruzada por *Babesia* sp., pois todos os cães PCR positivos para babesiose 13.36% (21/154), também foram PCR positivos para leishmaniose.

A ELISA rKDDR apresentou maior sensibilidade, 49% com IC de 95%: 40.71-57.78; já a ELISA rKDDR-Plus apresentou maior especificidade, 81% com IC de 95%: 62.12-91.49. A rKDDR-Plus apresentou maior VPP (90%), seguida pelo Extrato Bruto (86%) e rKDDR (80%). O maior índice de acurácia foi observada pela rKDDR (48%), seguida da rKDDR-Plus (46%) e Extrato Bruto (40%). Quando comparada com os outros dois testes, a rKDDR-Plus apresentou a maior área da curva ROC (AUC=0.6207; IC de 95%: 0.5485-0.6929), seguida por Extrato Bruto (AUC=0.6045 ; IC de 95%: 0.5319-0.6771) e rKDDR (AUC=0.5937 ; IC de 95%: 0.5208-0.6665). As análises de concordância com o teste molecular, definido como padrão ouro neste estudo, evidenciaram concordância pobre. A partir da qPCR foi determinada a carga parasitária dos cães, a média foi 1.827.679,36 e desvio padrão de 4.405.849,41, valor mínimo de 2.056,13 e máximo 27.831.407,07 de parasitos por 20 ng de DNA. Os cães foram avaliados para sinais e sintomas da LVC. A tabela 4 descreve as amostras de acordo com as categorias sexo, pele, condição corporal, unhas, linfonodos, lesões nasais e orais e conjuntivite. De acordo com a avaliação clínica, os cães foram classificados como suspeitos para LV 71,4% (110/154), clinicamente saudáveis 24% (37/154) e doentes 4,6 (7/154). Para todos os cães avaliados, foi realizado o cálculo da razão de chance (Odds Ratio - OR) levando em consideração sinais clínicos e sintomas para LV (**Tabela 5**).

Tabela 1– Concordância entre os testes imunocromatográficos e a PCR para *Leishmania* sp.

TESTES RÁPIDOS	TN (n=26)*	TP (n=128)**	FN	FP	p-valor [#]	SEN	ESP	κ^a	Concordância ^{β}
KDDR-PLUS	18	73	55	8	0.01	57%	69%	0.153	Pobre
BIO-MANGUINHOS	18	57	71	8	0.20	45%	69%	0.070	Pobre

Abreviações: (TN) teste negativo; (TP) teste positivo; (FN) falso negativo; (FP) falso positivo; (*) total de amostras negativas de acordo com a PCR; (**)total de amostras positivas de acordo com a PCR; (#) p-valor referente ao qui quadrado entre PCR para *Leishmania* sp. e teste rápido correspondente; (SEN) sensibilidade; (ESP) especificidade; (κ^a) valor de Kappa; (β) Concordância entre o teste correspondente e a PCR para *Leishmania* sp.

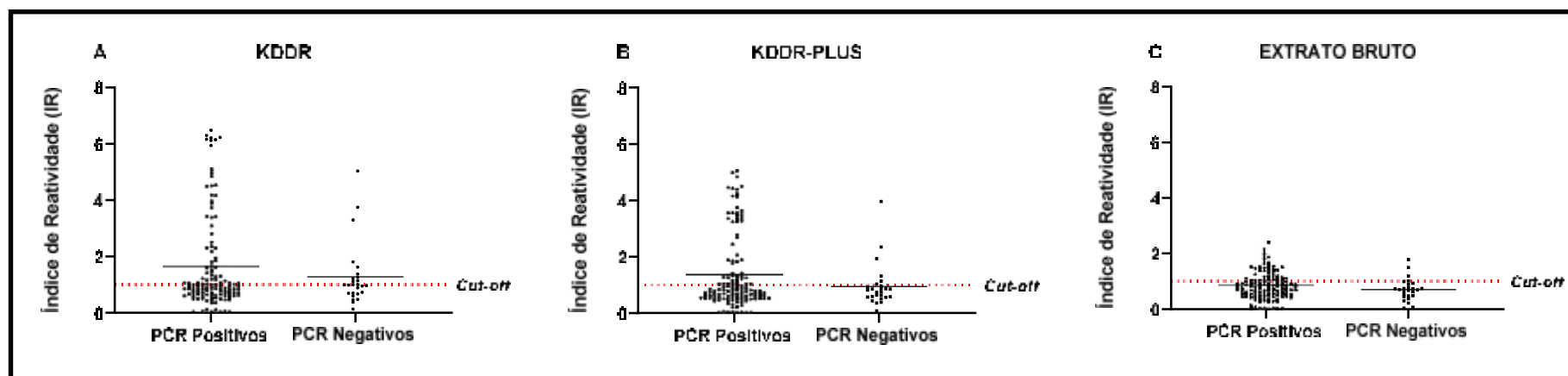


Figura 8 – Comparação da reatividade dos soros de cães nos testes de ELISA da rKDDR, rKDDR-Plus e Extrato Bruto de *Leishmania infantum*. Os diferentes testes de ELISA foram realizados com seguintes grupos de soros de cães: os cães foram distribuídos em dois grupos, positivo e negativo) de acordo com o resultado da PCR para *Leishmania* sp. No eixo das ordenadas está representado o Índice de Reatividade. No eixo das abscissas estão ordenados os diferentes grupos de soros de cães testados. A linha vermelha é o limite inferior de positividade (Índice de reatividade).

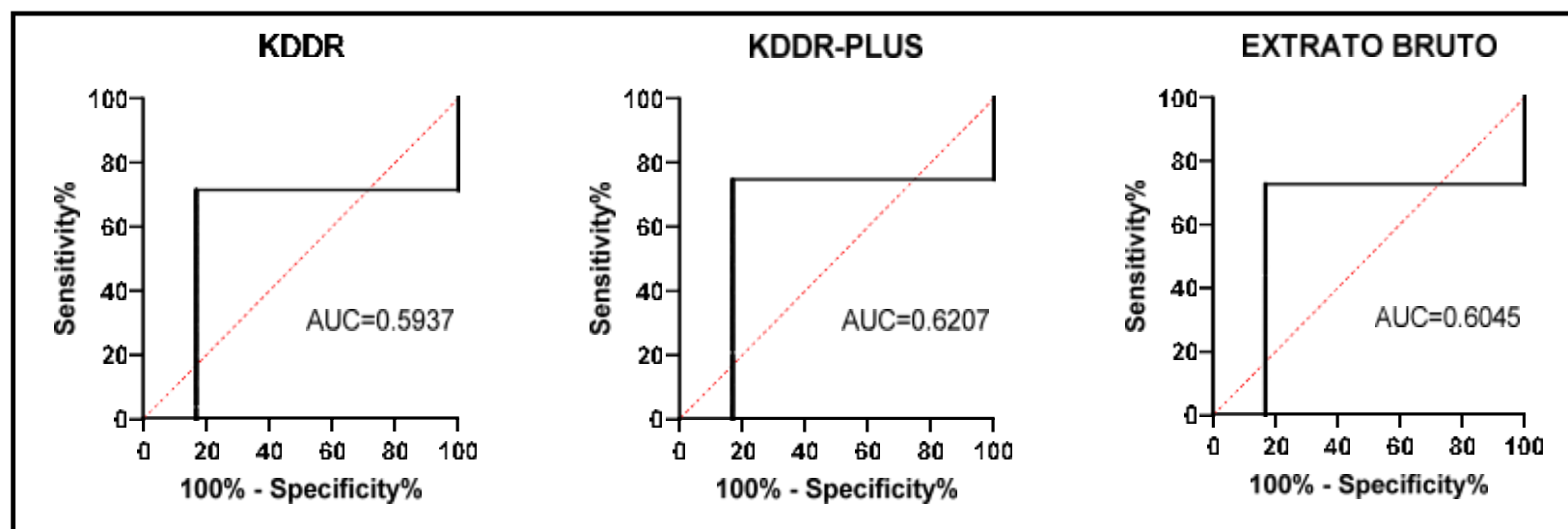


Figura 9 – Comparação das curvas ROC obtidas de cada teste: ELISA da rKDDR, rKDDR-Plus e Extrato Bruto de *Leishmania infantum*. As curvas ROC foram geradas pelo software Prisma 5.0 e com elas foram determinados os *cut-offs*, sensibilidade, especificidade e AUC (áreasob a curva). O eixo das ordenadas está representando as sensibilidades de cada teste. O eixo da abscissa está significando a especificidade de cada teste.

Tabela 2 – Percentuais de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia dos ensaios imunoenzimáticos ELISA da rKDDR, rKDDR-Plus e Extrato Bruto de *Leishmania infantum* em soros caninos para diagnóstico da LV canina

ELISA	Sensibilidade	IC 95%	Especificidade	IC 95%	VPP	VPN	AC
KDDR	49%	0.4071-0.5778	42%	0.2554-0.6105	80%	14%	48%
KDDR-PLUS	39%	0.3105-0.4772	81%	0.6212-0.9149	90%	21%	46%
EXTRATO BRUTO	34%	0.2671-0.4295	73%	0.5392-0.8630	86%	18%	40%

Abreviações: (SEN) sensibilidade; (ESP) especificidade; (IC) intervalo de confiança; (VPP) valor preditivo positivo; (VPN) valor preditivo negativo; (AC) acurácia.

Tabela 3 – Concordância dos testes de ELISA da rKDDR, rKDDR-Plus e Extrato Bruto de *Leishmania* sp. com o diagnóstico molecular para LVC

ELISA	AUC	IC 95%	TN (n=26)*	TP (n=128)**	FN	FP	p-valor [#]	κ^a	Concordância ^{β}
KDDR	0.5937	0.5208-0.6665	11	63	65	15	0.43	-.048	Pobre
KDDR-PLUS	0.6207	0.5485-0.6929	21	50	78	5	0.05	0.094	Pobre
EXTRATO BRUTO	0.6045	0.5319-0.6771	19	44	84	7	0.46	0.034	Pobre

Abreviações: (AUC) área sob a curva; (IC) intervalo de confiança; (TN) teste negativo; (TP) teste positivo; (FN) falso negativo; (FP) falso positivo; (*) total de amostras negativas de acordo com a PCR; (**)total de amostras positivas de acordo com a PCR; (#) p-valor referente ao qui quadrado entre a PCR para *Leishmania* sp. e ELISA correspondente; (SEN) sensibilidade; (ESP) especificidade; (κ^a) valor de Kappa; (β) Concordância entre o teste correspondente e a PCR para *Leishmania* sp.

Tabela 4 – Sinais e sintomas para LVC descritos de acordo com avaliação clínica

CATEGORIAS		AVALIAÇÃO CLÍNICA	NEGATIVO (n=26)	POSITIVO (n=128)
SEXO	Fêmea		16 (61.54%)	70 (54.69%)
	Macho		10 (38.46%)	58 (45.31%)
PELE	Normal		17 (65.38%)	80 (62.50%)
	Áreas De Alopecia, Hiperqueratose, Descamação		8 (30.77%)	28 (21.88%)
	Lesões Severas		1 (3.85%)	20 (15.63%)
CONDIÇÃO CORPORAL	Normal Ou Obeso		23 (88.46%)	95 (74.22%)
	Magro		3 (11.54%)	25 (19.53%)
	Caquexia		0 (0.0%)	8 (6.25%)
UNHAS	Normal		15 (57.69%)	67 (52.34%)
	Discretamente Aumentada		3 (11.54%)	16 (12.50%)
	Onicogrifose		8 (30.77%)	45 (35.16%)
LINFONODOS	Normais Ou Não Palpáveis		12 (46.15%)	47 (36.72%)
	Até 2 Aumentados		6 (23.08%)	41 (32.03%)
	3 Ou Mais Aumentados		8 (30.77%)	40 (31.25%)
LESÕES NASAIS/ORAIS	Ausente		23 (88.46%)	109 (85.16%)
	Uma Pequena Lesão		2 (7.69%)	4 (3.13%)
	2 Ou Mais Lesões		1 (3.85%)	15 (11.72%)
CONJUTIVITE	Ausente		24 (92.31%)	95 (74.22%)
	Discreta		1 (3.85%)	12 (9.38%)
	Grave		1 (3.85%)	21 (16.41%)

Tabela 5 – Análise de Odds Ratio e razão de prevalência entre a presença de um sinal clínico ou sintoma e ser positivo para LVC pela PCR

CATEGORIAS		Odds Ratio	IC 95%		p-valor
			Limite inferior	Limite superior	
PELE	Áreas De Alopecia, Hiperqueratose, Descamação	0,744	0,289	1,912	0,538
	Lesões severas	4,250	0,533	33,865	0,191
CONDIÇÃO CORPORAL	Magro	2,018	0,560	7,265	0,411
	Caquexia	1,242	1,137	1,357	0,349
UNHA	Discretamente Aumentada	1,194	0,308	4,626	1,000
	Onicogribose	1,259	0,493	3,216	0,629
LINFONODOS	Até 2 Aumentados	1,745	0,601	5,065	0,302
	3 Ou Mais Aumentados	1,277	0,475	3,432	0,628
LESÕES NASAIS/ORAIS	Uma Pequena Lesão	0,422	0,073	2,443	0,298
	2 Ou Mais Lesões	3,165	0,398	25,174	0,471
CONJUNTIVITE	Discreta	3,032	0,376	24,475	0,461
	Grave	5,305	0,679	41,436	0,125

DISCUSSÃO

Proteínas recombinantes vem sendo utilizadas atualmente na realização de testes de triagem e testes sorológicos confirmatórios, porém apresentando especificidade e sensibilidade abaixo do ideal, gerando números altos de testes falso-positivos e falso-negativos em áreas endêmicas [4,17,18]. No Brasil, o diagnóstico da LVC é realizado primeiramente a partir da triagem de cães utilizando o teste rápido DPP Bio-Manguinhos® (FIOCRUZ-Bio-Manguinhos, Brasil); posteriormente, os cães positivos para este teste são então submetidos a um segundo teste sorológico confirmatório pelo EIE-LVC (FIOCRUZ-Bio-Manguinhos, Brasil). O teste EIE-LVC da Bio-Manguinhos® é considerado como o teste sorológico padrão-ouro para o diagnóstico da LVC e recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil. Nesse estudo o teste imunocromatográfico rKDDR-Plus mostrou maior sensibilidade e idêntica especificidade com o DPP Bio-Manguinhos®, além disso o teste imunocromatográfico rKDDR-Plus mostrou melhor acurácia em diagnosticar cães para LV quando comparado ao DPP Bio-Manguinhos®. Este resultado está associado aos 15,3 motivos repetitivos além de 39 aminoácidos da kinesina que constituem o teste rápido rKDDR-Plus, tornando-o assim mais sensível quando comparado ao DPP Bio-Manguinhos®, que utiliza rK39 e rK26 [9,19].

Os resultados utilizando os antígenos rKDDR, rKDDR-PLUS e Extrato Bruto de *L. infantum* na ELISA, obtiveram área da curva ROC semelhantes $AUC=0.5937$, $AUC=0.6207$ e $AUC=0.6045$, respectivamente, evidenciando desempenho semelhante entre os testes. Quando comparados com a PCR, padrão ouro neste estudo, foi observada discordância entre os testes. A extração de DNA utilizado na PCR foi realizada utilizando amostras de sangue periférico e o diagnóstico sorológico positivo e molecular negativo pode estar associado a cães em condição crônica e a predileção do parasito por órgão linfóides, não sendo encontrado no sangue coletado para análise. Já cães recentemente infectados, na fase aguda da doença com baixa titulação de anticorpos circulantes, mas com alta carga parasitária, podem apresentar resultados sorológicos negativos e molecular positivo [20–23]. A média da carga parasitária entre os cães qPCR positivos foi de 1.827.679,36 parasitos por 20 ng de DNA, considerada alta. A discordância entre a ELISA pode estar associada também ao efeito prozona, que ocorre quando a quantidade de anticorpos no soro é desproporcional a quantidade antígenos do testes, gerando resultados falso-negativos. Devido a alta carga parasitária encontrada, a diluição dos soros analisados nesse estudo poderia gerar otimização da ELISA.

Em 2019 foi descrita uma doença similar a leishmaniose visceral em Aracaju, Sergipe. Nesta doença, a LV em um paciente humano foi confirmada pela microscopia de luz de amastigotas em aspirados de medula óssea, promastigotas em cultura após o isolamento do

parasito e por resultados sorológicos positivos de rK39. O sequenciamento do gene evidenciou que a cepa estava mais relacionada com *Crithidia sp.* do que com *Leishmania sp.* Esse estudo chama atenção para a necessidade de isolar e caracterizar parasitos de mais humanos, reservatórios e vetores. Como não foi realizado sequenciamento genético no presente estudo, sugere-se a hipótese que entre os cães analisados, pode-se haver portadores dessa nova doença, o que justificaria a discordância entre os métodos diagnósticos utilizados devido a reatividade cruzada [24].

Estudos anteriores em área endêmica para LVC indicam que cerca de 5-10% dos cães estão doentes e cerca de 90-95% dos cães são clinicamente saudáveis. De acordo com um modelo hipotético descrito anteriormente 1/3 dos cães clinicamente saudáveis não serão infectados, já 2/3 serão infectados devido a resposta celular deprimida e provavelmente desenvolverão sinais clínicos posteriormente [6]. Devido à ausência de sinais clínicos patognômicos o diagnóstico clínico da LVC é bastante complexo. Os sintomas mais comuns são: apatia, onicogribose, alterações cutâneas, perda de peso e hepatoesplenomegalia. Esses sinais clínicos e/ou sintomas estão associados a fase da doença, virulência da cepa e tipo de resposta imune produzida pelos cães infectados. Cães assintomáticos possuem um papel ativo na transmissão da doença e a infecção subclínica destes não é permanente. Fatores como imunossupressão e doenças concomitantes podem levar a infecções oportunistas e progressão da doença. Além disso, grande parte dos sintomas observados na LVC são provenientes de outras patologias caninas, dificultando o diagnóstico clínico. Considerando que a amostra foi composta principalmente por cães clinicamente saudáveis para LV e que todos os cães positivos para leishmaniose também estavam coinfectados com babesiose, acredita-se que os cães oligossintomáticos observados provavelmente são portadores de outras coinfeções não investigadas [21,25,26].

CONCLUSÃO

Desenvolver uma ferramenta que realize o correto diagnóstico da LVC é um grande desafio. A acurácia no diagnóstico da LVC evitaria a eutanásia de cães diagnosticados de forma incorreta pelos métodos utilizados atualmente. O teste imunocromatográfico (teste rápido) possui baixo custo e é de fácil execução não necessitando de mão de obra qualificada para sua realização e podendo ser utilizado em locais que não possuem infraestrutura laboratorial. Nesse estudo o dispositivo imunocromatográfico rKDDR-Plus apresentou maior acurácia em diagnosticar cães para LV em área endêmica. A partir deste resultado podemos sugerir a ampla utilização deste teste rápido como uma nova ferramenta para triagem de cães. Diagnósticos

mais sensíveis e específicos, seriam importantes para melhorar a compreensão da epidemiologia da doença em diferentes regiões, levando a criação de medidas de controle mais eficazes.

REFERÊNCIAS

1. Ross MR. Further notes on leishman's bodies. *Br Med J.* 1903;2: 1401. doi:10.1136/bmj.2.2239.1401
2. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10: 1–40. doi:10.1371/journal.pntd.0004349
3. Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin J-C, Soteriadou K, Dedet J-P, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104: 9375–9380. doi:10.1073/pnas.0703678104
4. Dantas-Torres F, Miró G, Bowman DD, Gradoni L, Otranto D. Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. *Trends Parasitol.* 2019;35: 97–101. doi:10.1016/j.pt.2018.11.005
5. Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, Miró G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12: 1–10. doi:10.1371/journal.pntd.0006082
6. Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasites and Vectors.* 2009;2: 1–8. doi:10.1186/1756-3305-2-S1-S1
7. Sarkari B, Rezaei Z, Mohebbali M. Immunodiagnosis of visceral leishmaniasis: Current status and challenges: A review article. *Iran J Parasitol.* 2018;13: 331–341.
8. Faria AR, de Castro Veloso L, Coura-Vital W, Reis AB, Damasceno LM, Gazzinelli RT, et al. Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum*-Infected Dogs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9: 13–16. doi:10.1371/journal.pntd.0003429
9. Dhom-lemos L, Gonc A, Cunha R, Mendes O, Rafael G, Pinheiro G, et al. *Leishmania infantum* recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. 2019;39: 1–17.
10. Miot HA. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. *J Vasc Bras.* 2011;10: 275–278. doi:10.1590/s1677-54492011000400001
11. Pessoa-e-Silva R, Vaitkevicius-Antão V, de Andrade TAS, de Oliveira Silva AC, de Oliveira GA, Trajano-Silva LAM, et al. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. *Exp Parasitol.* 2019;199: 9–16. doi:10.1016/j.exppara.2019.02.012

12. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol.* 1989;8: 151–156. doi:10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x
13. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2002;40: 210–215. doi:10.1128/JCM.40.1.210-215.2002
14. Carret C, Walas F, Carcy B. *Babesia canis canis*, *Babesia canis voaeli*, *Babesia canis rossi*: Society. 1999;46: 298–303.
15. Linnet K, Bossuyt PMM, Moons KGM, Reitsma JBR. Quantifying the accuracy of a diagnostic test or marker. *Clin Chem.* 2012;58: 1292–1301. doi:10.1373/clinchem.2012.182543
16. Fleiss JL, Spitzer RL, Endicott J, Cohen J. Quantification of agreement in multiple psychiatric diagnosis. *Arch. Gen. Psychiatry* 1972;26: 168–171.
17. Figueiredo FB, Vasconcelos TCB de, Madeira M de F, Menezes RC, Maia-Elkhoury ANS, Marcelino AP, et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113: e180260. doi:10.1590/0074-02760180260
18. Teixeira AIP, Silva DM, Vital T, Nitz N, De Carvalho BC, Hecht M, et al. Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A challenge for current and future tests. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019;114: 1–9. doi:10.1590/0074-02760180452
19. Villanueva-Saz S, Basurco A, Martín V, Fernández A, Loste A, Verde MT. Comparison of a qualitative immunochromatographic test with two quantitative serological assays for the detection of antibodies to *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Vet Scand.* 2019;61: 1–6. doi:10.1186/s13028-019-0473-1
20. Ribeiro VM, Miranda JB, Marcelino AP, de Andrade HM, Reis IA, Cardoso MS, et al. Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs. *Vet Parasitol.* 2019;274: 108920. doi:10.1016/j.vetpar.2019.08.014
21. Santarém N, Sousa S, Amorim CG, de Carvalho NL, de Carvalho HL, Felgueiras Ó, et al. Challenges in the serological evaluation of dogs clinically suspect for canine leishmaniasis. *Sci Rep.* 2020;10: 1–6. doi:10.1038/s41598-020-60067-6

22. NEITZKE-ABREU, H. C. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis using ear blood pcr in region of Brazil. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 2020;8: 1–6. 157-160.
23. Rocha MF, Michalsky ÉM, Lara-Silva F de O, Valadão JL, França-Silva JC, Pinheiro LC, 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 Negl Trop Dis.* 2020;14: 1–14. doi:10.1371/journal.pntd.0008079
24. Maruyama SR, De Santana AKM, Takamiya NT, Takahashi TY, Rogerio LA, Oliveira CAB, et al. Non-Leishmania parasite in fatal visceral leishmaniasis-like disease, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2019;25: 2088–2092. doi:10.3201/eid2511.181548
25. Gonçalves AAM, Leite JC, Resende LA, Mariano RM da S, Silveira P, Melo-Júnior OA de O, et al. An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9. doi:10.3389/fcimb.2019.00427
26. Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2014;3: 251–262. doi:10.1016/j.ijppaw.2014.08.004
27. Wilson Oliveira. Cães examinados e positivos para leishmaniose visceral entre 2004 e 2018. [mensagem pessoal] carolamadobiologa@hotmail.com. 19/06/2019
28. Ministério da Saúde [homepage na internet]. LEISHMANIOSE VISCERAL - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net [acesso em 12 de maio 2020]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>

5. REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. DE. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- CAMPOS, R. *et al.* Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. **Geospatial Health**, v. 12, n. 1, 2017.
- CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B. Babesia canis canis, Babesia canis voaeli, Babesia canis rossi: **Society**, v. 46, n. 3, p. 298–303, 1999.
- COSTA, D. N. C. C.; CODEÇO, C. T.; SILVA, M. A.; WERNECK, G. L. Culling Dogs in Scenarios of Imperfect Control: Realistic Impact on the Prevalence of Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, 2013.
- DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites and Vectors**, v. 2, n. SUPPL.1, p. 1–8, 2009.
- DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G.; BOWMAN, D. D.; GRADONI, L.; OTRANTO, D. Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 97–101, 2019.
- DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. When is an “asymptomatic” dog asymptomatic? **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3–4, p. 341–342, 2014.
- DHOM-LEMOIS, L. *et al.* Leishmania infantum recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS ONE** v. 39, p. 1–17, 2019.
- FARIA, A. R.; CASTRO VELOSO, L. DE; COURA-VITAL, W.; REIS, A. B.; DAMASCENO, L. M.; GAZZINELLI, R. T.; ANDRADE, H. M. Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic Leishmania infantum-Infected Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. 13–16, 2015.
- FIGUEIREDO, F. B.; VASCONCELOS, T. C. B. DE; MADEIRA, M. DE F.; MENEZES, R. C.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; MARCELINO, A. P.; WERNECK, G. L. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 11, p. e180260, 2018.
- FLEISS JL, SPITZER RL, ENDICOTT J, COHEN J 1972. Quantification of agreement in multiple psychiatric diagnosis. **Arch. Gen. Psychiatry** 26: 168–171.
- FREITAS, E. DE; MELO, M. N.; COSTA-VAL, A. P. DA; MICHALICK, M. S. M. Transmission of Leishmania infantum via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1–2, p. 159–167, 2006.

FREITAS, J. C. C. DE; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; LOPES NETO, B. E.; SANTOS, G. J. L.; ABREU, C. R. A. DE; BRAGA, R. R.; CAMPOS, R. DE M.; OLIVEIRA, L. F. DE. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 24–29, fev. 2012.

GONÇALVES, A. A. M. *et al.* An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. December, 2019.

GRIMALDI, G.; TEVA, A.; DOS-SANTOS, C. B.; SANTOS, F. N.; PINTO, I. D. S.; FUX, B.; LEITE, G. R.; FALQUETO, A. Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–18, 2017.

IBGE, 2018. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Aracaju, Sergipe, Brazil.

<<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/se/panorama>>

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210–215, 2002.

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

LEITE, B. M. M.; SOLCÀ, M. DA S.; SANTOS, L. C. S.; COELHO, L. B.; AMORIM, L. D. A. F.; DONATO, L. E.; PASSOS, S. M. DE S.; ALMEIDA, A. O. DE; VERAS, P. S. T.; FRAGA, D. B. M. The mass use of deltamethrin collars to control and prevent canine visceral leishmaniasis: A field effectiveness study in a highly endemic area. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 5, p. 1–19, 2018.

LINNET, K.; BOSSUYT, P. M. M.; MOONS, K. G. M.; REITSMA, J. B. R. Quantifying the accuracy of a diagnostic test or marker. **Clinical Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 1292–1301, 2012.

LUKEŠ, J. *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 22, p. 9375–9380, 2007.

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

MAIA, Z.; LÍRIO, M.; MISTRO, S.; MENDES, C. M. C.; MEHTA, S. R.; BADARO, R. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, 2012.

MARUYAMA, S. R. *et al.* Non-*Leishmania* parasite in fatal visceral leishmaniasis-like disease, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 11, p. 2088–2092, 2019.

MILLÁN, J.; FERROGLIO, E.; SOLANO-GALLEGO, L. Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. **Parasitology Research**, v. 113, n. 6, p. 2005–2014, 2014.

Ministério da Saúde. LEISHMANIOSE VISCERAL - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>>. acesso em 12 de maio 2020

MIOT, H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, n. 4, p. 275–278, 2011.

NEITZKE-ABREU, H. C. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis using ear blood pcr in region of Brazil. **Adv. Anim. Vet. Sci.**, v. 8. p. 157-160, 2020

PAIVA CAVALCANTI, M. DE; FELINTO DE BRITO, M. E.; SOUZA, W. V. DE; MIRANDA GOMES, Y. DE; ABATH, F. G. C. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **Veterinary Journal**, v. 182, n. 2, p. 356–358, 2009.

PAZ, G. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MAGALHÃES, D. F. DE; SATHLER, K. P. B.; MORAIS, M. H. F.; FIÚZA, V. O. P.; BRANDÃO, S. T.; WERNECK, G. L.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 97, n. 2, p. 131–133, 2010.

PESSOA-E-SILVA, R.; VAITKEVICIUS-ANTÃO, V.; ANDRADE, T. A. S. DE; OLIVEIRA SILVA, A. C. DE; OLIVEIRA, G. A. DE; TRAJANO-SILVA, L. A. M.; NAKASONE, E. K. N.; PAIVA-CAVALCANTI, M. DE. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. **Experimental Parasitology**, v. 199, n. February, p. 9–16, 2019.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 151–156, 1989.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915–1934, 2009.

RÊGO, F. D.; RUGANI, J. M. N.; SHIMABUKURO, P. H. F.; TONELLI, G. B.; QUARESMA, P. F.; GONTIJO, C. M. F. Molecular detection of leishmania in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cutaneous leishmaniasis focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–14, 2015.

RIBEIRO, V. M.; MIRANDA, J. B.; MARCELINO, A. P.; ANDRADE, H. M. DE; REIS, I. A.; CARDOSO, M. S.; GONTIJO, C. M. F.; PAZ, G. F. Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 274, n. April, p. 108920, 2019.

ROCHA, M. F.; MICHALSKY, É. M.; LARA-SILVA, F. DE O.; VALADÃO, J. L.; FRANÇA-SILVA, J. C.; PINHEIRO, L. C.; SOUSA, J. F. DE; SANTOS, R. C. DOS; SOARES, M. D.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. 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**, v. 14, n. 2, p. 1–14, 2020.

RODRIGUES DE OLIVEIRA, A. *et al.* Competence of non-human primates to transmit *Leishmania infantum* to the invertebrate vector *Lutzomyia longipalpis*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 4, p. e0007313, 2019.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251–262, 2014.

ROSÁRIO, E. Y. DO; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T. DA; 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. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 197–203, 2005.

ROSS, M. R. Further notes on leishman's bodies. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2239, p. 1401, 1903.

ROSYPAL, A. C.; TROY, G. C.; ZAJAC, A. M.; FRANK, G.; LINDSAY, D. S. Transplacental Transmission of a North American Isolate of *Leishmania infantum* in an Experimentally Infected Beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970–972, 2006.

SANTARÉM, N.; SOUSA, S.; AMORIM, C. G.; CARVALHO, N. L. DE; CARVALHO, H. L. DE; FELGUEIRAS, Ó.; BRITO, M.; SILVA, A. C. DA. Challenges in the serological evaluation of dogs clinically suspect for canine leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2020.

SARKARI, B.; REZAEI, Z.; MOHEBALI, M. Immunodiagnosis of visceral leishmaniasis: Current status and challenges: A review article. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 13, n. 3, p. 331–341, 2018.

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1–2, p. 55–59, 2009.

SIQUEIRA, S. F. PRODUÇÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA rKDDR-plus: Desenvolvimento de um novo antígeno recombinante com alto grau de motivos repetitivos para o uso no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina. 2018. Dissertação (Mestrado em Parasitologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1–2, p. 1–18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 86, 2011.

TEIXEIRA, A. I. P.; SILVA, D. M.; VITAL, T.; NITZ, N.; CARVALHO, B. C. DE; HECHT, M.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, E.; RABELLO, A.; ROMERO, G. A. S. Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A challenge for current and future tests. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 1, p. 1–9, 2019.

TOLENTINO, N.; PINHEIRO, G. R. G.; OTTINO, J.; OLIVEIRA, A. R. DE; COELHO, C. M.; TINOCO, H. P.; FUJIWARA, R. T.; SANTOS, R. L.; RIBEIRO, V. M. Serological evidence of *Leishmania* infection by employing ELISA and rapid tests in captive felids and canids in Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 17, n. May, p. 100308, 2019.

TRAVI, B. L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2018.

VELEZ, R.; GÁLLEGO, M. Commercially approved vaccines for canine leishmaniasis: a review of available data on their safety and efficacy. **Tropical Medicine and International Health**, v. 00, n. 00, p. 1–18, 2020.

VILLANUEVA-SAZ, S.; BASURCO, A.; MARTÍN, V.; FERNÁNDEZ, A.; LOSTE, A.; VERDE, M. T. Comparison of a qualitative immunochromatographic test with two quantitative serological assays for the detection of antibodies to *Leishmania infantum* in dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 61, n. 1, p. 1–6, 2019.

Wilson Oliveira. Cães examinados e positivos para leishmaniose visceral entre 2004 e 2018. [mensagem pessoal] Mensagem recebida por: carolamadobiologa@hotmail.com. Em: 19/06/2019

ZANATTA COUTINHO, M. T.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; MARIA, M. DE; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 1–2, p. 149–155, 2005.

ZANETTE, M. F.; LIMA, V. M. F. DE; LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; VIDES, J. P.; VIEIRA, R. F. DA C.; BIONDO, A. W.; MARCONDES, M. 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**, v. 47, n. 1, p. 105–107, 2014.

ANEXOS

Anexo I. Aprovação do Comitê de ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Sergipe.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Validação do método diagnóstico rKDDr-Plus para leishmaniose visceral canina em abrigos de animais da Grande Aracaju - SE", registrada com o nº 05/2019, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Silvio Santana Dolabella que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 30/04/2019.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 13/05/2019, Término: 29/06/2019
Especie/linhagem/raca	Canis lupus familiaris
Nº de animais	331 - M 330 - F
Peso/idade	10 Kg / 3 anos
Sexo	M e F
Origem	Abrigos da Grande Aracaju/SE

Josemar Sena Batista
Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA
Coordenador do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"
Jardim Rosa Elze - São Cristóvão - SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606

Anexo II. Termo de Consentimento Livre Esclarecido

INSTRUÇÕES PARA ELABORAÇÃO

1. O TCLE deverá ser elaborado em 2 (duas) vias, ficando uma com o proprietário e outra com o responsável pela disciplina que deverá guardá-lo por, pelo menos, 5 (cinco) anos, devendo ambas ser assinadas.
2. Este documento deve proporcionar o entendimento completo do plano de aula e de todas as suas implicações para o proprietário e animal participante.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Título do projeto: Avaliação do antígeno rKDDR-Plus para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina em abrigos de animais de Aracaju/SE

Nome do pesquisador principal: Silvio Santana Dolabella Razão social da Instituição: Universidade Federal de Sergipe CNPJ: 13.031.547/0001-04
CIAEP da Instituição da CEUA que aprovou:

Objetivos do estudo: Avaliar o antígeno rKDDR-Plus para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral canina em abrigos de animais da Grande Aracaju – SE.

Procedimentos a serem realizados com os animais: A coleta será realizada em um único momento, será coletada uma amostra de material da conjuntiva ocular através de um swab estéril e será coletado de 2 a 10 mL de sangue, de acordo com o peso e idade do animal, através da veia jugular.

Potenciais riscos para os animais: O método de coleta sanguíneo utilizado é o procedimento indicado devido a sua rapidez e baixo grau de invasividade, apresentando mínimo ou nenhum risco para os animais. Pode ocorrer equimoses e/ou hematomas no sítio da punção.

Cronograma: As coletas irão ocorrer entre as datas de 13/05/2019 e 29/06/2019.

Benefícios: Os animais participantes do estudo serão avaliados clinicamente por meio de testes

rápidos e laboratoriais para Leishmaniose Visceral canina de forma gratuita. Posteriormente ao final da análise dos resultados cada abrigo receberá um relatório individual por cão que descreverá todo e qualquer sinal clínico e/ou achado referente a infecção citada ou outra infecção cruzada.

ESCLARECIMENTOS AO PROPRIETÁRIO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DO ANIMAL NESTE PROJETO

Sua autorização para a inclusão do (s) seu (s) animal (is) nesse estudo é voluntária. Seu (s) animal (is) poderá (ão) ser retirado (s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele (s).

A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

O Médico Veterinário responsável pelo (s) seu (s) animal (is) será o (a) Dr. (a) Guilherme Rafael Gomide Pinheiro, inscrito (a) no CRMV – MG sob o nº 13179. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal Silvio Santana Dolabella também se responsabilizará pelo bem-estar do (s) seu (s) animal (is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos:

Tel. de emergência: (79) 99136-6407

Equipe: PROF. DR. Ricardo Toshio Fujiwara PROF. DR. Silvio Santana Dolabella ME.
Guilherme Rafael Gomide Pinheiro Mestranda Ana Carolina Amado Gomes

Endereço: Universidade Federal de Sergipe

Programa de Pós-Graduação de Biologia Parasitária Cidade Universitária Professor José
Aloísio Campos Av. Marechal Rondon, s/n
Bairro Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE

Telefone: (79) 3194-6340

Email: probpufs@gmail.com

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Fui devidamente esclarecido (a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao (s) animal (is) pelo (s) qual (is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu (s) animal (is) do estudo a qualquer momento.

Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do (s) meu (s) animal (is) identificado (s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Aracaju, _____ de _____ de _____.

Nome

Assinatura do (a) responsável pelo (s) animal (is):

Documento de Identidade (quando aplicável):

Assinatura do Pesquisador Responsável:

APÊNDICES

APENDICE I. Ficha de avaliação clínica dos cães (uma ficha por cão).

FICHA DE AVALIAÇÃO DOS CÃES			
ID:	SEXO: <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M	ABRIGO:	FOTO:
CATEGORIAS	SINAIS E SINTOMAS PARA LVC		
PELE	Normal <input type="checkbox"/>	Áreas de alopecia, hiperqueratose, descamação <input type="checkbox"/>	Lesões severas <input type="checkbox"/>
CONDIÇÃO CORPORAL	Normal ou obeso <input type="checkbox"/>	Magro <input type="checkbox"/>	Caquexia <input type="checkbox"/>
UNHA	Normal <input type="checkbox"/>	Discretamente aumentada <input type="checkbox"/>	Onicogribose <input type="checkbox"/>
LINFONODOS	Normais ou não palpáveis <input type="checkbox"/>	Até 2 aumentados <input type="checkbox"/>	3 ou mais aumentados <input type="checkbox"/>
LESÕES NASAIS E/OU ORAIS	Ausente <input type="checkbox"/>	Uma pequena lesão <input type="checkbox"/>	2 ou mais lesões <input type="checkbox"/>
CONJUNTIVITE	Ausente <input type="checkbox"/>	Discreta <input type="checkbox"/>	Grave <input type="checkbox"/>