

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

SARA MARIA MARQUES DE SOUZA

**COMPARAÇÃO DA PERFORMANCE ENTRE TESTES RÁPIDOS EM AMOSTRAS
DE SORO DE CÃES SADIOS, VACINADOS E NATURALMENTE INFECTADOS
POR *Leishmania infantum*.**

RIO DE JANEIRO-2022

SARA MARIA MARQUES DE SOUZA

**COMPARAÇÃO DA PERFORMANCE ENTRE TESTES RÁPIDOS EM AMOSTRAS
DE SORO DE CÃES SADIOS, VACINADOS E NATURALMENTE INFECTADOS
POR *Leishmania infantum*.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dr. Fabiano Borges Figueiredo e Dra. Isabella Dib Ferreira Gremião.

Rio de Janeiro 2022

SARA MARIA MARQUES DE SOUZA

**COMPARAÇÃO DA PERFORMANCE ENTRE TESTES RÁPIDOS EM AMOSTRAS
DE SORO DE CÃES SADIOS, VACINADOS E NATURALMENTE INFECTADOS
POR *Leishmania infantum*.**

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dr. Fabiano Borges Figueiredo
Dra. Isabella Dib Ferreira Gremião

BANCA EXAMINADORA

Dra. Monique Paiva de Campos (Presidente)
Doutora em Ciências
Instituto Carlos Chagas - Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Fernanda Nunes Santos
Doutora em Ciências
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas- Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Tassia Cristina Bello de Vasconcelos
Doutora em Medicina Veterinária
Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, pelas bênçãos e força concedidas durante todo o percurso.

Ao meu orientador Dr. Fabiano Borges Figueiredo pela oportunidade, confiança e paciência nesses dois anos de convívio. Muito obrigada por tudo.

À minha orientadora Dra. Isabella Dib Ferreira Gremião, por todo auxílio, ensinamentos e revisões neste trabalho.

À Dra. Monique Paiva de Campos, que foi essencial nesta caminhada e oportunidade deste projeto. Agradeço por todos os ensinamentos e apoio. Obrigada pela paciência, por esclarecer minhas dúvidas, e por todo acompanhamento, sugestões e correções realizadas durante esta trajetória. Obrigada pela amizade construída ao longo desses 8 anos, desde quando eu era sua IC. Muito obrigada.

À Dra Aline Rangel dos Santos Renzetti por toda ajuda e horas de trabalho cedidas para realização dos exames, por todo incentivo e apoio quando eu mais precisava. Muito obrigada.

Ao meu marido Daniel Nunes de Souza Martins que sempre me incentivou desde o início do projeto. Obrigada pelo apoio nas horas de dúvidas e questionamentos. Agradeço por todos os sacrifícios e batalhas que nós enfrentamos e pelas bênçãos (dois filhos lindos) que colhemos durante essa jornada que se iniciou na graduação para que eu chegasse até aqui.

Aos meus filhos, Raquel e Mateus (nasceu durante o mestrado) por toda paciência durante a minha ausência. Agradeço pelas palavras e momentos únicos que só eles podem me dar, por cada: “ eu te amo” e “fica tranquila mamãe” que minha filha Raquel disse para acalmar meu coração.

Ao Lapclin-Dermzoo, Artur Velho, Adilson Benedito, Renato Ornellas. Obrigada pela força e amizade sempre.

SOUZA, S. M. M. **Comparação entre testes rápidos em amostras de soro de cães saudáveis, vacinados e naturalmente infectados por *Leishmania infantum***. 38f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2022.

Resumo

Leishmaniose visceral é uma zoonose causada, no Brasil, por *Leishmania infantum*. O cão atua como principal reservatório doméstico do parasito. Nos cães, a leishmaniose visceral canina (LVC) pode ocorrer cronicamente, apresentando um amplo espectro de sinais clínicos ou de forma assintomática, dependendo do sistema imunológico do animal. Atualmente, os testes recomendados pelo Ministério da Saúde são: para triagem, o teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso (TR DPP®LVC, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), que possui como antígeno uma proteína recombinante (rk28) de *L. infantum* como confirmatório, o ELISA, que também é oriundo de Bio Manguinhos. O DPP®LVC só está disponível para rede pública, para controle da LVC em municípios com casos positivos e suspeitos, e em Laboratórios Centrais (LACEN). O médico veterinário particular não tem acesso ao DPP®LVC o que prejudica o controle, pois as clínicas veterinárias recebem animais suspeitos e o diagnóstico é diferente do recomendado pelo MS. Além disso, devido à grande utilização do DPP®LVC, muitas vezes a produção não acompanha a demanda, sendo importante a avaliação técnica para a validação de testes alternativos que venham a suprir essa demanda. Na rede particular existem dois testes rápidos para diagnóstico da LVC, Alere® leishmaniose e SNAP® Leishmania, mas não foram feitos testes pareados com o DPP®LVC em cães naturalmente infectados, saudáveis e vacinados. Nosso estudo utilizou 80 amostras de soro e/ plasma de cães saudáveis (20), vacinados (40) e naturalmente infectados (20) para realização dos testes rápidos, DPP®LVC, Alere® leishmaniose e o SNAP® Leishmania. Os resultados obtidos foram que dentre os testes o SNAP® Leishmania e o Alere® leishmaniose, ambos apresentaram 100% de especificidade e 80% e 71,4% de sensibilidade respectivamente, mostrando assim que ambos os testes podem ser utilizados na falta do DPP®LVC nos inquéritos epidemiológicos. Podemos concluir que ambos os testes são confiáveis para diagnóstico de cães saudáveis e vacinados, sendo que dentre os testes utilizados na rede particular o SNAP® Leishmania apresentou melhor especificidade.

Palavras-chave: leishmaniose, cão, diagnóstico, teste rápido.

SOUZA, S. M. M. **Comparison between rapid tests in serum samples from healthy, vaccinated and naturally infected dogs with Leishmania Infantum.** 38f. Thesis [Master Thesis in Clinical Research on Infectious Diseases] - Oswaldo Cruz Foundation, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases. Rio de Janeiro, 2022.

Abstract

Visceral leishmaniasis is a zoonosis caused in Brazil by *Leishmania infantum*. The dog acts as the main domestic reservoir of the parasite. In dogs, canine visceral leishmaniasis (CVL) can occur chronically, presenting a wide spectrum of clinical signs or asymptotically, depending on the animal's immune system. Currently, the tests recommended by the Ministry of Health are: for screening, the rapid dual-path immunochromatographic test (TR DPP®LVC, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil), which has a recombinant protein (rk28) as antigen. *infantum* and as confirmatory, the ELISA, which also comes from Bio Manguinhos. The DPP®LVC is only available for the public network, for the control of LVC in municipalities with positive and suspected cases, and in Central Laboratories (LACEN). The private veterinarian does not have access to the DPP®LVC, which impairs control, as veterinary clinics receive suspicious animals and the diagnosis is different from that recommended by the MS. In addition, due to the great use of DPP®LVC, production often does not keep up with demand, and technical evaluation is important for the validation of alternative tests that may meet this demand. In the private network, there are two rapid tests for the diagnosis of CVL, Alere® leishmaniasis and SNAP® Leishmania, but paired tests with DPP®LVC were not performed in naturally infected, healthy and vaccinated dogs. Our study used 80 serum and plasma samples from healthy (20), vaccinated (40) and naturally infected (20) dogs to perform the rapid tests, DPP®LVC, Alere® leishmaniasis and SNAP® Leishmania. The results obtained were that among the tests SNAP® Leishmania and Alere® leishmaniasis, both showed 100% specificity and 80% and 71.4% sensitivity respectively, thus showing that both tests can be used in the absence of DPP®LVC in epidemiological surveys. We can conclude that both tests are reliable for diagnosing healthy and vaccinated dogs. Among the tests used in the private network, the SNAP® Leishmania showed better specificity.

Keywords: leishmaniasis, dog, diagnosis, rapid test.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 LEISHMANIOSES	12
1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	13
1.3 EPIDEMIOLOGIA	14
1.4. DIAGNÓSTICO	15
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVO GERAL	17
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4 METODOLOGIA	18
4.1 DESENHO DO ESTUDO	18
4.2 CASUÍSTICA	18
4.2.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO	19
4.3 ANÁLISE DE DADOS	20
5 RESULTADOS	22
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÃO	32
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1- TesteAlere® Leishmaniose	21
Figura 2- TesteSNAP® Leishmaniose	21
Figura 3 - Cães sadios Tempos 1 e 3	24
Figura 4- Cães assintomáticos TesteAlere® Leishmaniose	25
Figura 5- Cães sintomáticos TesteAlere® Leishmaniose	25
Figura 6- Cães assintomáticos e sintomáticos Teste SNAP® Leishmaniose	26
Figura 7- Cães sintomáticos I 80 e assintomáticos I 114, I 115, Leishmaniose	I 119 TesteDPP® 27

LISTA DE TABELAS

Tabela1 -Resultado Testes Rápidos Alere® Leishmaniose, SNAP® Leishmaniose, DPP® Leishmaniose e ELISA	23
Tabela2 - Resultado amostras discordantes dos Testes Rápidos Alere® Leishmaniose, SNAP® Leishmaniose, DPP® Leishmaniose e ELISA dos cães naturalmente infectados	23
Tabela3 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) valor preditivo negativo (VPN) e valor de p dos TRs avaliados no estudo, Intervalo de confiança (IC) dos cães naturalmente infectados.	28

LISTADE ABREVIATURAS E SIGLAS

LVC - leishmaniose visceral canina

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz MAPA

- Ministério da agricultura e pecuária e abastecimento

(ELISA-*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*(Ensaio de imunoabsorção enzimática)

DPP - Dual Path Platform

LACEN- Laboratório Central

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

INI - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

Lapclin-Dermzoo - Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos

PCR -*Polimerase Chain Reaction*(Reação em cadeia da polimerase)

SUBVISA - Subsecretaria de Vigilância, Fiscalização Sanitária e Controle de Zoonose VPN

- Valor Preditivo Negativo

VPP - Valor Preditivo Positivo

IC - Intervalo de confiança

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

A Leishmaniose Visceral é causada por *Leishmania (L) infantum*, é transmitida pela picada do flebotômio vetor *Lutzomia longipalpis* (NERY *et al.*, 2017a). As leishmanioses já foram descritas em vários animais selvagens, incluindo carnívoros, roedores, equídeos e primatas (FERNANDES *et al.*, 2019), no entanto, o principal reservatório urbano da LV é o cão doméstico e sabe-se que os casos caninos antecedem o aparecimento de casos humanos (VAZ *et al.*, 2020). O Brasil apresenta 90% dos casos da América Latina, sendo quase 3 mil pessoas infectadas anualmente; a doença que anteriormente apresentava-se em áreas rurais, desde 1980 se expande para o meio urbano, causando epidemias e aumento de incidência e letalidade; o controle da LV baseia-se no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, redução da população de flebotômios, eliminação dos cães reservatórios e atividades de educação em saúde. (ZUBEN; DONALÍSIO, 2016).

A LV é imunomediada, tanto em cães quanto em seres humanos. Porém, nos cães, a morbidade e mortalidade são maiores; isso ocorre, provavelmente, pela maior quantidade de parasitos que os cães apresentam em órgãos do sistema fagocítico mononuclear como o baço, fígado, medula e também na pele porque os parasitos estão presentes principalmente em pele íntegra; os cães infectados podem desenvolver sintomas da doença, como também podem ser oligossintomáticos e assintomáticos. (WINCK, 2018)

A LV envolve uma complexa cadeia epidemiológica entre humanos, cães, flebotômios e protozoários. A presença do cão doméstico como reservatório deste patógeno, e por ter íntima relação com o homem é considerada um dos principais riscos para o aumento epidêmico da LV (LEWGOY; MASTRANGELO; BECK, 2020).

1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA(LVC)

A LVC é caracterizada por alterações clínicas muito variáveis, envolvendo quase todos os órgãos, ao longo do período de incubação que pode variar de meses até vários anos, e aos mecanismos patogênicos do protozoário, essa complexidade faz com que os animais infectados permaneçam circulantes como reservatório, não existindo um consenso científico sobre seu manejo (FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

As manifestações clínicas mais comuns e anormalidades clínico-patológicas encontradas são linfadenomegalia generalizada, perda de peso corporal, diminuição ou aumento do apetite, letargia, palidez das membranas mucosas, esplenomegalia, poliúria, polidipsia, febre, vômito e diarreia (CAMPOS, *et al.*, 2013). As lesões cutâneas estão relacionadas como principal sintoma.(SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011)

Os sinais clínicos daLVCpodem ser classificados quanta a gravidade do quadro, sendo que alguns animais podem apresentar apenas um sinal clinico da doençaporemgrave, a insuficiência renal aguda e um sintoma grave daLVC. (FREITAS *et al.*,2012).

Estudos da LVC têm revelado um grande número de animais soropositivos assintomáticos. Portanto tanto cães assintomáticos infectados por *Leishmania*, bem como os sintomáticos, podem ter um papel importante na manutenção da infecção e, provavelmente, no estabelecimento do ciclo doméstico de transmissão e pela presença de parasita disponíveis nas duas formas clínicas nas áreas endêmicas de LVC (FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

A LVC pode estar mais frequente em cães jovens por estar relacionado a uma menor maturidade imunológica e a velocidade de reposição dos animais no campo após a eutanásia (SANTOS *et al.*, 2017).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

A LV representa um grave problema de saúde pública, e é considerada uma doença potencialmente fatal, se não tratada precocemente e de forma adequada. Cerca de 90% dos casos de LV ocorrem em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil. (WINCK, 2018)

Organização Mundial da Saúde recomenda a eutanásia de cães como medida ideal de controle da LVC, no entanto autores reivindicam há certo tempo que a eutanásia não seria a forma mais eficaz no controle da leishmaniose visceral em cães soropositivos; ainda nesse contexto, pesquisadores apontam que a combinação de coleiras impregnadas de inseticidas e o controle vetorial teriam um impacto mais significativo na disseminação em humanos. (GONTIJO; MELO, 2004)

Atualmente, a eliminação de cães soropositivos é realizada apenas no Brasil; todavia a ação parece não ser efetiva, pois devido às várias formas de manifestações clínicas surgem dificuldades para o diagnóstico da doença, sendo que cães sintomáticos e assintomáticos são infectantes para o vetor. (MESTRE; FONTES, 2007). A questão ainda é complexa devido não apenas a ausência de cura parasitológica, existem ainda algumas outras medidas de controle como vetorial e medidas de educação e saúde, mas os aspectos sociais e econômicos que prejudicam o acesso ao tratamento canino, assim como o adequado monitoramento desses animais, devendo ser analisado com cautela, caso a caso. (ARAÚJO; COSTA; RISSO, 2018).

O Ministério da Saúde realizou estudo em alguns municípios sobre a efetividade do uso em grande escala da coleira com deltametrina 4%. O resultado demonstrou que o encoleiramento em massa produz efeito protetor efetivo não só dos que usam as coleiras, mas também nos não encoleirados. (NERY *et al.*, 2017b).

O tratamento em cães infectados não é recomendado pelo Ministério da Saúde, não podendo ser realizado com medicamentos de uso humano, para que não haja

resistência do parasito. Apesar do tratamento induzir a remissão temporária dos sinais clínicos, não previne a recidiva da doença, muito menos a cura parasitológica(MINISTÉRIO DA SAÚDE, [s. d.]

Recentemente, um novo medicamento baseado em miltefosina (Milteforan®Virbac)teve seu registro autorizado na nota técnica conjunta nº001/2016 –MAPA/MS parao uso veterinário, no tratamento deLVC.Segundo a nota técnica, a miltefosinaestáautorizada seu uso para o tratamento de leishmaniose tegumentar em humanos MINISTÉRIO DA SAÚDE, [s. d.]

A miltefosina se tornou um importante medicamento no tratamento de LVC, devido ao seu diferente modo de ação, com base em uma atividade antiparasitária direta e não dependendo de sistema imunológico funcional, sua facilidade de administração, por via oral, e baixa toxicidade. (MATEO *et al.*, 2009).

1.4 DIAGNÓSTICO

Atualmente os métodos utilizados para o diagnóstico são o teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso (TR DPP®LVC,Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), que possui como antígeno uma proteína recombinante(rk28) de *L. infantum*, como teste de triagem, e um ELISA Bio Manguinhos como confirmatório. O teste rápido realizado em amostras de soro apresenta-se como ensaio simples, rápido, de baixo custo e, portanto, adequado para ser empregado como técnica de triagem diagnóstica em função de sua especificidade para as espécies do complexo *Leishmania donovani*, responsáveis pela LV.(THOMAZ-SOCCO *et al.*, 2009).Em virtude de alta complexidade do diagnóstico daLVC,devido a presença de sinais clínicos inespecíficos e a presença de cães assintomáticos, faz-se necessário o uso de testes que combinam velocidade, sensibilidade, especificidade e exijam o mínimo de equipamentos e complexidade de realização.(CAMPUS, *et al.*, 2017) O teste rápido Dual Path Platform(DPP®

-leishmaniose visceral canina), desenvolvido pelo Instituto de Bio Manguinhos trata-se de um ensaio imunocromático de triagem que emprega de um lado, a combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal, e de outro, antígenos recombinantes rk28(fusão de rk9,rk26 e rk39) específicos de *Leishmania* ligados à uma membrana de nitrocelulose. Se houver a presença de anticorpos anti-*L.infantum*na amostra testada, estas reagirão com os antígenos recombinantes, em sequência, se ligarão à combinação de proteína A e ouro

coloidal, fornecendo o resultado positivo por meio de reação de cor.(TEIXEIRA *et al.*, 2019) Segundo Nota Técnica do Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis de 2011, o teste rápido imunocromático -DPP® passaria a ser o teste de triagem nos inquéritos caninos(NOTA-TÉCNICA.PDF, [s. d.]

No entanto, atualmente, a produção de DPP® não está atendendo a demandanacional de diagnóstico, e alternativas diagnósticas são necessárias para manter as atividades de vigilância e controle da LVC. Para ser utilizado no diagnóstico da LVC, os kits diagnósticos necessitam ter registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.(NOTA-TÉCNICA.PDF, [s. d.]

No mercado atual está disponível comercialmente, com este registro, o teste rápido imunocromatográfico (TRI de plataforma única), produzido pela empresa Alere®. TRI Alere® Leishmaniose AcTestKit é um imunoenensaio imunocromatográfico para detecção qualitativa de anticorpos anti *L. infantum*, através da proteína recombinante rK28 (antígenos rK9, rK39 e rK26) em amostras de soro, plasma ou sangue total canino, com resultados qualitativos (positivo ou negativo) para o diagnóstico animal.

Outro TRI é o SNAP® Leishmania é um ensaio imunoenzimático que utiliza reagentes altamente purificados na plataforma ELISA. A tecnologia baseada em peptídeos do SNAP® Test permite a avaliação apenas de anticorpos altamente específicos para *Leishmania* que ajuda a descartar coinfeções que potencialmente interferem no diagnóstico sorológico (falso-positivos) , nos casos de animais não sororreagentes para LVC. Conforme o fabricante, apresenta 99,2% de Especificidade e 96,3% de Sensibilidade (SNAP LEISHMANIA - IDEXX BRASIL, [s. d.]). Sua utilização visa identificar cães que apresentam infecção por *L. infantum* e *L. donovani*(CAMPOS, et al, 2017) .

A importância do diagnóstico da LVC no Brasil está no fato de que, dentre as estratégias de controle da doença encontra-se o controle do cão sorologicamente positivo (LARANJEIRA *et al.*, 2014). Na tentativa de interromper o ciclo de transmissão e diminuir a prevalência da LVC, nas áreas endêmicas, o Ministério da Saúde preconiza para o controle do reservatório canino a realização de inquérito sorológico e eutanásia em cães sororreagentes (ABRANTES *et al.*, 2018). No entanto, essa prática parece não estar sendo efetiva para a diminuição dos números de casos e para a preservação de áreas não endêmicas(SILVA; MADEIRA; FIGUEIREDO, 2015).

Protocolos terapêuticos também têm sido testados, entretanto a cura parasitológica dos animais infectados ainda não foi comprovada.(PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2004).

Atualmente existe a liberação para uso da vacina Leish tec, sendo utilizada como forma de prevenção e controle da LVC, porém ela não é 100% eficaz na prevenção da doença sendo seu uso controlado em paralelo com o uso de coleiras repelentes e manejo do ambiente e do animal.(PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

A LVC é observada precedendo a doença humana e sua expansão está relacionada à dificuldade no controle do reservatório. A introdução das vacinas anti-leishmania nas clínicas veterinárias gerou preocupações em relação à saúde pública devido à possível soroconversão nos testes sorológicos do Ministério da Saúde. Em 2011, esse Ministério, por meio da nota técnica 01/2011, instituiu um protocolo que conta com o DPP como teste de triagem, porém esse teste apenas é disponibilizado para a rede pública. No entanto, há um grande número de cães suspeitos sendo atendidos em redes particulares que utilizam outros tipos de teste rápido que não foram validados, não realizando o diagnóstico recomendado pelo MS, o que pode levar a um diagnóstico impreciso pela falta de um teste validado como o DPP. Atualmente, está disponível comercialmente, com este registro, o TRI de plataforma única produzido pela empresa Alere®. TRI Alere® LeishmanioseAcTestKit é um ensaio imunocromatográfico para detecção qualitativa de anticorpos anti *L.infantum*, através da proteína recombinante rK28 (antígenos rK9, rK39 e rK26) em amostras de soro, plasma ou sangue total canino, com resultados qualitativos (positivo ou negativo) para o diagnóstico animal. Outro TRI é o SNAP® *Leishmania* que utiliza reagentes altamente purificados na plataforma ELISA. Desta forma, faz-se necessário que os testes disponíveis na rede particular sejam avaliados pareando-os com o teste validado pelo Ministério da Saúde em cães infectados, sadios e vacinados. Assim, o diagnóstico da LVC poderá ser melhor indicado e gerar informações sobre a soroconversão de cães vacinados anti-leishmania na rede particular, o que pode auxiliar no controle da enfermidade, facilitando o diagnóstico e não dependendo somente da rede pública.

3. OBJETIVO GERAL

Comparar os testes rápidos Alere® Leishmaniose e SNAP®*Leishmania* com o teste recomendado pelo Ministério da Saúde DPP® (Dual Path Platform) em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, sadios e vacinados.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar os testes DPP® (Dual Path Platform), Alere® Leishmaniose e SNAP®*Leishmania* em amostras de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, sadio e vacinados.
- Realizar o Elisa nas amostras positivas nos testes rápidos provenientes dos cães.
- Comparar o resultado dos testes rápidos.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo diagnóstico com três diferentes testes rápidos para LVC.

4.2 CASUÍSTICA

Foi utilizada uma amostra composta por 20 cães naturalmente infectados sendo 10 sintomáticos e 10 assintomáticos, 20 sadios e 20 vacinados provenientes de outro estudo que tiveram suas amostras clínicas previamente coletadas e seus soros armazenados a -20°C.

4.2.1 População do estudo

Os cães do grupo controle (sadios) são aqueles que pertencem ao canil do Exército sendo as amostras coletadas antes da vacinação (T0) com resultado negativo para LVC .

Os cães do canil do Exército foram selecionados e imunizados, respeitando o protocolo vacinal indicado pelos fabricantes (três doses num intervalo de 21 dias). Caso algum animal fosse considerado positivo para LVC, seria encaminhado para eutanásia no Laboratório de Pesquisas Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos-INI/Fiocruz (Lapclin-Dermzoo), conforme recomendação do Ministério da Saúde do Brasil.

Critérios de inclusão: Cães sadios de ambos os sexos, com exame parasitológico negativo para LVC, com idade superior a quatro meses idade na qual está liberada a vacinação

Critério de exclusão: Cães gestantes, imunocomprometidos por medicamento ou doença de base, imunizados previamente com vacinas anti-*Leishmania*, com amostras biológicas insuficientes para as análises.

Esses cães foram selecionados e separados em dois grupos. O grupo 1 foi vacinado com a Leish-Tec® e o grupo 2 com a Leishmune®. E foram acompanhados durante um ano após a vacinação, com coleta de amostras biológicas em diferentes tempos: um mês (Tempo1), seis meses (Tempo2), 12 meses (Tempo3).

Neste estudo foram utilizadas as amostras de soro e/ou plasma dos cães do grupo 1 Leish-Tec® e grupo 2 Leishmune® nos Tempos 1 e 3.

O grupo de cães infectados foi proveniente do município de Barra Mansa no estado do Rio de Janeiro, área endêmica da doença, já positivados nos testes sorológicos preconizados pelo Ministério da Saúde.

Após a coleta do sangue dos grupos sadios, imunizados e infectados, as amostras foram reservadas em uma soroteca para posterior utilização neste estudo.

4.2.2 Metodologia dos testes

Para a realização do teste DPP® (Dual Path Platform), foi utilizado soro, plasma ou sangue (aproximadamente 5 ul), conforme recomendações do fabricante. Os testes foram considerados positivos quando as duas faixas, referindo-se a amostra de teste e controle, forem visíveis.

Para a realização do teste Alere® Leishmaniose (Figura 1), foi utilizado soro e plasma (aproximadamente 10 ul), conforme recomendações do fabricante. Os testes foram considerados positivos quando as duas faixas, referindo-se a amostra de teste e controle, fossem visíveis.

Para a realização do teste SNAP® *Leishmania* foi utilizado soro, plasma ou sangue (aproximadamente 2 gotas), conforme recomendações do fabricante. O teste foi considerado positivo quando o ponto de controle positivo e o ponto de amostra *Leishmania* desenvolveram coloração.

O EIE-leishmaniose (KIT EIE-LC) Biomanguinhos/Fiocruz utiliza promastigotas *Leishmania major*-like (MHOM/BR/76/JOF) produzidas por Biomanguinhos/Fiocruz como antígeno. Este exame sorológico imunoenzimático foi usado como teste de confirmação nos casos em que os resultados forem obtidos no DPP® (Dual Path Platform) positivo em qualquer um dos tempos de exame, conforme recomendado pelo MS.

Como em nosso estudo trabalhamos com amostras de uma soroteca de um estudo anterior, para comparação temporal de testes rápidos, todos os cães positivos foram encaminhados para eutanásia, conforme protocolo do Ministério da Saúde.

4.4 ANÁLISE DE DADOS

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística para determinar a existência de diferença significativa entre os TRs. A sensibilidade de cada TR foi calculada dividindo-se o número de verdadeiro positivos – VP (positivos nos dois TRs e na qPCR) pelo número de VP + o número de falso negativos – FN (negativo no TR; positivo na qPCR). A especificidade de cada TR foi calculada pela divisão do número de verdadeiro negativos – VN (negativos nos dois TRs e na qPCR) pelo número de VN + o número de falso positivos – FP (positivo no TR; negativo na qPCR). O intervalo de confiança e valores preditivos foram calculados.



Figura 1 - Alere® Leishmaniose Fonte:<http://alerevet.com.br/Leishmaniose.html>



Figura 2 - SNAP® Leishmania (SNAP LEISHMANIA - IDEXX BRASIL, [s.d])

Os resultados obtidos foram organizados em um banco de dados e processados com auxílio do *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 16.0.

Os valores de sensibilidade, especificidade e os intervalos de confiança dos testes foram calculados utilizando-se como padrão de referência (ELISA) a conjunção dos resultados dos exames de Elisa com o auxílio do programa Microsoft Office Excel 2003.

Os resultados foram comparados em tabelas de contingência 2x2. Além disso, foram considerados significativos resultados do teste estatístico McNemar com p -valor $< 0,05$

5 RESULTADOS

No teste rápido preconizado pelo Ministério da Saúde e utilizado em instituições públicas, o DPP LVC, utilizamos o lote 2025L007Z para o total de 80 cães divididos em grupos, sendo os resultados para os grupos sadios (20) e vacinados nos tempos 1(20) e 3(20) 100% negativo e para o grupo de infectados sintomáticos (10) e assintomáticos(10) 100% positivos.

No teste rápido imunocromatográfico **Alere® Leishmaniose**, para o total de 80 cães divididos em grupos os resultados foram para o grupo sadios (20) e vacinados nos tempos 1(20) e 3(20) 100% negativos e para o grupo de infectados sintomáticos (10) 8 positivos, infectados assintomáticos(10) 4 positivos, apresentando então (20) 4 do total das amostras falso negativo conforme Tabela 1

No teste rápido imunoenzimático **SNAP®Leishmania**, para o total de 80 cães divididos em grupos sendo o resultado para o grupo sadios e vacinados nos tempos 1 e 3 100% negativos e para o grupo de infectados sintomáticos (10) 9 positivos, infectados assintomáticos(10) 6 positivos, apresentando então (20) 25% das amostras falso negativo, conforme tabela 1

No teste EIE-leishmaniose (KIT EIE-LC) Biomanguinhos/Fiocruz as amostras dos cães positivos nos testes rápidos apresentaram resultados positivos em 100% das amostras, conforme tabela 1, não havendo diferença entre os grupos de sintomáticos e assintomáticos.

Tabela 1-Resultados dos testes rápidosDPP® (Dual Path Platform), Alere® Leishmaniose eSNAP®Leishmania,EIE-leishmaniose (KIT EIE-LC)

CÃES Total = 80	DPP® (Dual Path Platform)	Alere® Leishmaniose	SNAP®Leishmania	EIE-leishmaniose (KIT EIE-LC) Padrão confirmatório
Sadios (20)	Negativo 100%	Negativo 100%	Negativo 100%	
VacinadosT1 (20)	Negativo 100%	Negativo 100%	Negativo 100%	
VacinadosT3 (20)	Negativo 100%	Negativo 100%	Negativo 100%	
Infectados sintomáticos (10)	Positivos 100%	Positivos 80%	Positivos 90%	Positivos 100%
Infectados assintomáticos (10)	Positivos 100%	Positivos 40%	Positivos 60%	Positivos 100%

Fonte:Elaborado pela autora.

Tabela 2-Amostras discordantes dos testes rápidos e o Elisa

CÃES infectados Total = 20	DPP® (Dual Path Platform)	Alere® Leishmaniose	SNAP® <i>Leishmania</i>	EIE-leishmaniose (KIT EIE-LC) Padrão ouro
SINTOMÁTICOS (10)	POSITIVOS (10)	NEGATIVOS (2)	NEGATIVOS (1)	POSITIVOS (10)
ASSINTOMÁTICOS (10)	POSITIVOS (10)	NEGATIVOS (6)	NEGATIVOS (3)	POSITIVOS (10)

Fonte:Elaborado pela autora.

Nos três testes rápidos nos cães sadios e vacinados, os resultados em todas as amostras foram negativos nos três testes, não apresentando falso positivo, porém quando analisadas as amostras dos cães infectados sintomáticos e assintomáticos, os testes Alere® Leishmaniose e SNAP®*Leishmania* apresentaram resultados falsos negativos, sendo que o DPP apresentou todos os resultados positivos.

Figura 3-Cães sadios tempo 1 e tempo 3



Fonte: Elaborado pela autora.

O Alere® Leishmaniosedentre os sintomáticos do grupo infectados(FIGURA 4) apresentou dois resultados negativos e nos cães assintomáticos (Figura 5) apresentou seis resultados negativos, conforme a tabela 2

O SNAP®*Leishmania*(FIGURA 6)apresentou dentre os sintomáticos uma amostra negativa e dentre os assintomáticos apresentou três amostras negativas, conforme a tabela 2.

Figura 4-cães sintomáticos teste Alere® Leishmaniose



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5-cães assintomáticos teste Alere® Leishmaniose



Fonte: Elaborado pela autora.

[Digite aqui]

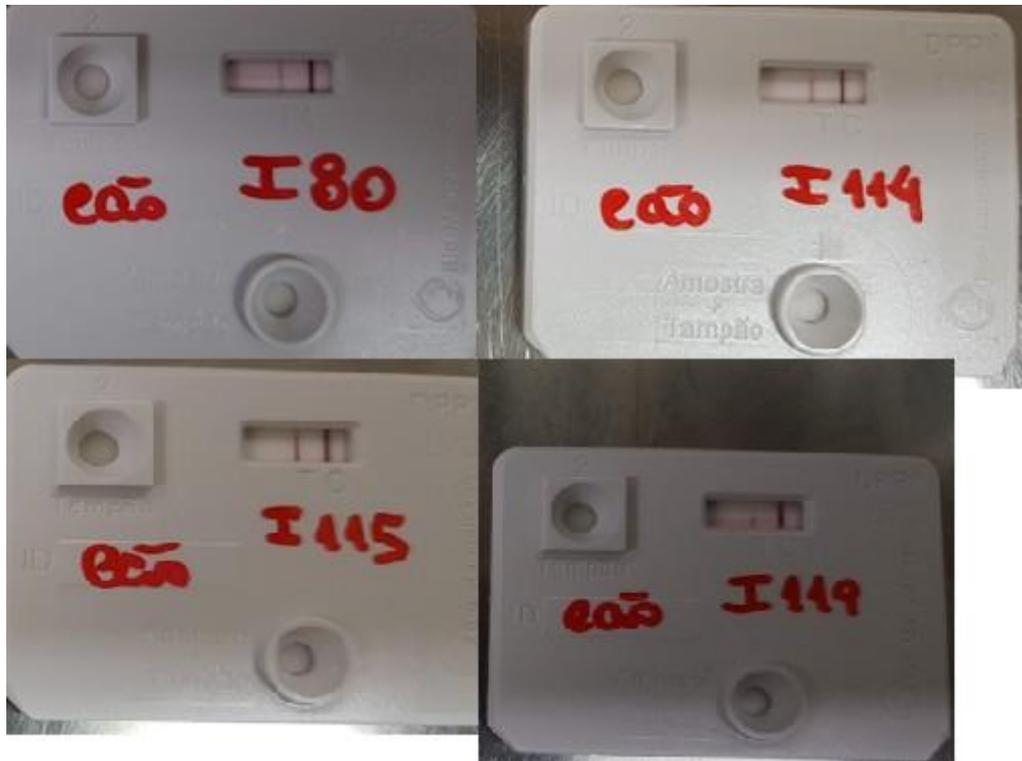
Figura 6-Cães sintomáticos e assintomáticos Teste SNAP®Leishmania



Fonte: Elaborado pela autora.

Dentre todas amostras que apresentaram o resultado negativo nos cães infectados em ambos os testes rápidos (Alere® Leishmaniose e SNAP® *Leishmania*) cinco delas pertenciam ao mesmos cães (I80, I114, I115, e I119), Figura 4, 5 e 6 apresentando resultado positivo no DPP e no Elisa. (figura 7).

Figura 7-Cães sintomático (I80) e assintomáticos (I 114, 115, e 119) DPP® (Dual Path Platform)



Fonte: Elaborado pela autora.

Quando analisada a amostra total, o teste DppLVCapresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 100%. O teste Alere® Leishmanioseapresentou sensibilidade de 71,4% e especificidade de 100%. O teste SNAP®Leishmania apresentou sensibilidade de 80% e especificidade de 100%. Podemos observar dentre os TRs o Alere®Leishmanioseapresentou 85% de acurácia, o SNAP®Leishmania apresentou 95% e o DPP 100%,sendoutilizado o intervalo de confiança de 95%, ou seja $p < 0,05$.

No valor-p de 0,0578 é observado que não houve diferença. Um valor tão extremo para a estatística de teste é esperado em menos de 5% das vezes. Podemos dizer que estatisticamente não houve diferença entre os testes utilizados neste estudo.

Tabela 3-Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e valor p dos TRs avaliados no estudo. IC: intervalo de confiança nos cães naturalmente infectados

Cães naturalmente infectados		DPP®%	Alere® %	SNAP® %	Elisa %	Valor de p %
Sensibilidade		100	71,4	80	100	0,578
Especificidade	100	100	100	100	100	0,561
Valor Preditivo Positivo	100	100	100	100	100	0,561
Valor Preditivo Negativo	100	88	93	100	100	0,578
Acurácia	100	85	95	100	100	0,578

Fonte:Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico da LVC é o primeiro passo para o controle da doença e sua correta detecção evitando a eutanásia desnecessária e o controle correto da doença, por isso é importante obter resultados sorológicos precisos e corretos. Os testes rápidos são um caminho favorável para o controle da LVC, pois apresentam a praticidade de serem feitos em uma clínica sem a necessidade de um ambiente laboratorial. Os inquéritos sorológicos realizados juntamente com a eutanásia de cães soropositivos são estratégias de controle canino para a doença, porém na prática não funciona muito bem pois existem outras questões como por exemplo o ônus emocional de tutores e profissionais (COSTA *et al.*, 2020). A imprecisão do resultado sorológico pode prejudicar não só o diagnóstico mas também as investigações epidemiológicas para o controle da LVC. (ROSÁRIO *et al.*, 2018).

No presente estudo foram avaliados e comparados dois testes rápidos disponíveis na clínica particular, o Alere® Leishmaniose e o SNAP® Leishmania com o teste rápido preconizado pelo Ministério da Saúde, DPP® (Dual Path Platform). Sendo o Elisa, o teste utilizado como confirmatório em casos positivos.

Foi observado estatisticamente em relação a sensibilidade dos testes, entre o Alere® Leishmaniose (71,4%) o SNAP® Leishmania (80%) e o DPP (100%) (Tabela 2), mostrando que o DPP apresentou maior acurácia. No entanto o teste está apenas disponível para inquéritos sorológicos em instituições públicas, sua comparação com os demais testes torna-se de grande importância pois podemos analisar cada teste individualmente. Adicionalmente podemos dizer que o teste SNAP apresentou maior sensibilidade que o teste ALERE.

O Alere® Leishmaniose é de fácil execução e não necessita de refrigeração, podendo ser mantido em temperaturas de 2 a 30°C. (ALERE LEISHMANIOSE, [s.d.]) similar ao DPP.

O SNAP® Leishmania deve ser mantido em temperatura de 2 a 8°C e sua execução decorre de uma plataforma tipo Elisa sendo um pouco mais elaborada, com maior número de etapas até a obtenção do resultado final, possuindo uma etapa de lavagem aumentando a especificidade, e a amostra passa por um fluxo bidirecional, aumentando a chance de antígeno (SNAP LEISHMANIA - IDEXX BRASIL, [s. d.]).

Contudo o nosso estudo mostrou que animais sadios e vacinados em todos os TRs tiveram o diagnóstico negativo, com a especificidade

[Digite aqui]

100% o que resulta em resultados confiáveis para detecção de cães verdadeiramente soropositivos. (Figura 3 e 4).

Conforme estudo realizado por (CAMPOS, *et al.*, 2017) demonstrou que animais vacinados, independente da vacina utilizada, não foram capazes de soro converter no TR DPP preconizado pelo MS, corrobora os resultados do nosso estudo, no qual animais vacinados utilizados com o esquema completo (tempo 3) das vacinas **Leish-Tec®** e **Leishmune®** não soroconverteram no DPP. Além disso, eles não soroconverteram nos demais TRs **Alere®** **Leishmaniose** e **SNAP®** **Leishmania** (Figuras 3 e 4).

A vacina **Leish-Tec®** aprovada pelo MAPA e disponibilizada para comercialização na rede privada é um método de profilaxia utilizado para LVC (PALATNIK-DE-SOUSA, 2008) junto a outras formas de prevenção da doença. **BRAZIL; DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2003**, facilitando assim o manejo de animais positivos, pois nosso estudo mostra que os testes sorológicos disponíveis na rede particular apresentaram alta especificidade garantindo assim um controle maior da LVC na rede particular pois muitos cães são vacinados contra a LVC.

A diferença dos resultados sorológicos entre os animais sintomáticos e assintomáticos foi observada nos testes **Alere®** **Leishmaniose** e **SNAP®** **Leishmania** comparando com o DPP o teste preconizado pelo MS. Houve baixa precisão dos testes disponíveis para rede particular em diagnosticar animais doentes com falso negativos em ambos os grupos de animais infectados, o DPP no entanto mostrou sensibilidade de 100% não obtendo resultados errôneos; conforme estudo os soros de cães assintomáticos e sintomáticos contém níveis detectáveis de anticorpos mesmo aqueles sem parasitismo tecidual, sendo o IgG1 o mais predominante comparando com cães não infectados. (LARANJEIRA *et al.*, 2014), com isso a detecção dos cães infectados torna-se possível devido a quantidade de anticorpos mesmo sem parasitismo tecidual, e que os animais infectados podem ser assintomáticos pois não apresentam parasitismo tecidual que é um sintoma bem característico da doença. A metodologia aplicada difere o DPP de ambos os testes da rede particular, pois mesmo apresenta uma combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal e anticorpos específicos da amostra para **Leishmania**, por apresentar duas etapas de acionamento com o conjugado específico, diferente do **Alere®** **Leishmaniose** que apresenta apenas uma etapa com o conjugado. Acredita-se que esse método possa ter interferido na precisão deste teste, contudo em relação ao **SNAP®** **Leishmania** por ser um imunoensaio

enzimático que utiliza antígeno purificado, apresenta uma etapa que mistura o conjugado amostra, proporcionando assim maior ligação antígeno anticorpo, após a mistura a solução é colocada no dispositivo que deverá ser acionado para liberação de agentes armazenados dentro do teste ativando-o, sendo proporcional a quantidade de anticorpos no sangue do animal infectado aprimorando a sua especificidade ou seja os casos não infectados

Nas diferenças dos métodos utilizados houve uma relação entre os resultados principalmente nos casos dos animais assintomáticos cuja sensibilidade dos testes de rede particular apresentaram falso negativos; o nosso estudo mostrou que dentre os testes rápidos disponíveis para médicos veterinários o SNAP®Leishmania é mais sensível que o Alere®Leishmaniose, podendo ser utilizado na rede particular para o controle da doença, no entanto para vigilância epidemiológica ainda o DPP se mantém com alta sensibilidade e especificidade para controle sanitário.

Este cenário sorológico estudado passa por diversos desafios associados ao diagnóstico de cães sadios e naturalmente infectados vivenciado por clínicos veterinários, pois necessitam de testes precisos para evitar a eutanásia e/ou tratamento errado, por se tratar de uma zoonose a LVC precisa ser controlada e estudada.

7 CONCLUSÃO

- Nosso estudo apontou que os testes sorológicos disponíveis no mercado para clínicas particulares apresentam uma sensibilidade menor quando comparados com o TRsDPPdo Ministério da Saúde, para diagnosticar animais doentes, porém ambos ostestesapresentaram alta especificidade para descartar os cães saudáveis.
- Concluimos que ambos os testes SNAP®Leishmania eAlere® Leishmanioseforamsensíveis e específicos e que podem ser utilizados em inquéritos epidemiológicos na falta doDPP.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2016-CHA-LEISH-INFORME-EPI-DAS-AMERICAS.PDF. [S. l.:s. n.], [s. d.]. Disponível em:

<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2016-cha-leish-informe-epi-das-americas.pdf>. Acesso em: 1 ago. 2020.

ABRANTES, T.R. *et al.* Fatores ambientais associados à ocorrência de leishmaniose visceral canina em uma área de recente introdução da doença no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, [S. l.], v.34, n. 1, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0102-311X2018000105013&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 26 jul. 2020.

ALERE LEISHMANIOSE. [s. d.]. Disponível em: <https://alerevet.com.br/Leishmaniose.html>. Acesso em: 14 fev. 2022.

ALMEIDA, A. N. F. *de et al.* Vigilância da leishmaniose cutânea em amostras clínicas: distribuição da *Leishmania guyanensis* no estado do Amapá, 2018. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [S. l.], v. 29, p. e2018504, 17 fev. 2020. Disponível em: <https://scielosp.org/article/ress/2020.v29n1/e2018504/>. Acesso em: 26 jul. 2020.

ARAÚJO, C.; COSTA, A.; RISSO, J. USO DA MILTEFOSINACOMO TERAPIA COMBINADA EM LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA – RELATODECASO.

Enciclopédia Biosfera, [S. l.], v.15, n. 27, p. 106–116, 20 jun. 2018. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2018a/agrar/uso%20da%20mitelfosina.pdf>. Acesso em: 1 ago. 2020.

BRAZIL; DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF: Editora MS, 2003. Disponível em: <http://books.google.com/books?id=d49gAAAAMAAJ>. Acesso em: 24 jul. 2020.

CAMPOS, Monique Paiva *de et al.* Can vaccines against canine visceral leishmaniasis interfere with the serological diagnostics recommended by the Brazilian Ministry of Health? **Ciência Rural**, [S. l.], v. 47, n. 4, 2017a. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000400503&lng=en&tlng=en. Acesso em: 7 maio 2020.

CAMPOS, Monique Paiva *de et al.* Can vaccines against canine visceral leishmaniasis interfere with the serological diagnostics recommended by the Brazilian Ministry of Health? **Ciência Rural**, [S. l.], v.47, n. 4, 6 mar. 2017 b. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000400503&lang=pt.

CAMPOS, Monique Paiva *de et al.* First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Volta Redonda, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S. l.], v.22, n. 3, p. 424–426, set. 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612013000300424&lang=pt.

CAMPOS, M.P. *et al.* Accuracy of quantitative polymerase chain reaction in samples of frozen and paraffin-embedded healthy skin for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S. l.], v.69, n. 6, p. 1443–1450, nov. 2017. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352017000601443&lang=pt

CONTI, R.V. *et al.* Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil. **J Vector Borne Dis**, [S. l.], p.6, 2016.

COSTA, D. N. C. C. *et al.* Controle da leishmaniose visceral canina por eutanásia: estimativa de efeito baseado em inquérito e modelagem matemática. **Cadernos de Saúde Pública**, [S. l.], v.36, n. 2, 21 fev. 2020. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2020000205008&lang=pt.

FERNANDES, M. A. *et al.* Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA according to clinical stages of leishmaniasis in dog. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S. l.], v.28, n. 2, p. 194–202, abr. 2019. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612019000200194&tlng=en. Acesso em: 26 jul. 2020.

FIGUEIREDO, M. J. de F. M. *et al.* Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. **Ciência Animal Brasileira**, [S. l.], v.15, n. 1, p. 102–106, mar. 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-68912014000100013&lang=pt

FREITAS, J. C. C. *et al.* Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v.45, n.1, p. 24–29, fev. 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822012000100006&lang=pt

GONTIJO, C. M.F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [S. l.], v.7, n. 3, p. 338–349, set. 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2004000300011&lang=pt.

LARANJEIRA, D.F. *et al.* Serological and infection statuses of dogs from a visceral leishmaniasis-endemic area. **Revista de Saúde Pública**, [S. l.], v.48, n. 4, p. 563–571, ago. 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102014000400563&lang=pt

LEWGOY, B.; MASTRANGELO, A.; BECK, L. Tanatopolítica e biossegurança: dois regimes de governo da vida para a leishmaniose visceral canina no Brasil. **Horizontes Antropológicos**, [S. l.], v.26, n. 57, p. 145–176, ago. 2020

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-71832020000200145&tlng=pt
 . Acesso em: 26 jul. 2020.

MATEO, M.*et al.* Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 105, n. 1, p. 155–162, jul. 2009.

MESTRE, G. L. da C.; FONTES, C. J.F. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998–2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v.40, n. 1, p. 42–48, fev. 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822007000100008&lang=pt

MINISTÉRIO DA SAÚDE. [s. d.]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html. Acesso em: 1 ago. 2020.

NERY, G.*et al.* Avaliação da infectividade parasitária a *Lutzomyia longipalpis* por xenodiagnóstico em cães tratados para leishmaniose visceral naturalmente adquirida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v.37, n. 7, p. 701–707, jul. 2017a. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2017000700701&lang=pt.

NERY, G.*et al.* Avaliação da infectividade parasitária a *Lutzomyia longipalpis* por xenodiagnóstico em cães tratados para leishmaniose visceral naturalmente adquirida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v.37, n. 7, p. 701–707, jul. 2017b. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2017000700701&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 26 jul. 2020.

NOTA-TECNICA.PDF. [S. l.:s. n.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>. Acesso em: 1 ago. 2020.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.*et al.* Improving methods for epidemiological control of canine visceral leishmaniasis based on a mathematical model. Impact on the incidence of the canine and human disease. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S. l.], v.76, n. 3, p.583–593, set. 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652004000300012&lang=pt

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, [S. l.], v. 26, n. 14, p. 1709–1724, 25 mar. 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X08000819>. Acesso em: 14 fev. 2022.

ROSÁRIO, C. J. R. M.*et al.* Avaliação de IFN- γ e IL-10 em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* com e sem manifestações clínicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v.38, n. 4, p. 722–725, abr. 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2018000400722&lang=pt.

SANTOS, H. D. *et al.* High frequency of visceral leishmaniasis in dogs under veterinary clinical care in an intense transmission area in the state of Tocantins, Brazil. **Ciência Rural**, [S. l.], v.47, n. 3, 5 jan. 2017. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000300501&lang=pt

SILVA, C. M. H. de S.; WINCK, C. A. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: REVISÃO DE LITERATURA. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, [S. l.], v. 16, n. 1, 13 fev. 2018. Disponível em: <http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/3383>. Acesso em: 1 ago. 2020.

SILVA, D. A. da; MADEIRA, M. de F.; FIGUEIREDO, F. B. GEOGRAPHICAL EXPANSION OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN RIO DE JANEIRO STATE, BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S. l.], v.57, n. 5, p. 435–438, out. 2015. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652015000500435&lng=en&tlng=en. Acesso em: 7 maio 2020.

SILVA, D. A. da; MADEIRA, M. de F.; FIGUEIREDO, F. B. GEOGRAPHICAL EXPANSION OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN RIO DE JANEIRO STATE, BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S. l.], v.57, n. 5, p. 435–438, out. 2015. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652015000500435&lang=pt

SNAP LEISHMANIA - IDEXX BRASIL. [s. d.]. Disponível em: <https://www.idexx.com.br/pt-br/veterinary/snap-tests/snap-leishmania/>. Acesso em: 14 fev. 2022a.

SNAP LEISHMANIA - IDEXX BRASIL. [S. l.:s. n.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.idexx.com.br/pt-br/veterinary/snap-tests/snap-leishmania/>. Acesso em: 14 fev. 2022b.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 86, dez. 2011. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-4-86>. Acesso em: 26 jul. 2020.

TEIXEIRA, A. I. P. *et al.* Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v.114, 31 jan. 2019. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762019000100307&lang=pt

THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S. l.], v.18, n. 3, p. 46–51, set. 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-2009000300008&lang=pt

VAZ, T. P. *et al.* Evaluation of the euthanasia of seropositive dogs for canine visceral leishmaniasis as the only method of controlling the disease in the enzootic area in the Midwestern Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v.40, n. 2, p.107–112, fev. 2020. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0100-736X2020000200107&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 30abr.2020.

WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASES; WORLD HEALTH ORGANIZATION (Org.). **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010**. Geneva: World Health Organization, 2010 (WHO technical report series, 949).

ZUBEN, A. P. B. von; DONALÍSIO, M. R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, [S. l.], v. 32, n. 6, 20 jun. 2016. Disponível em: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2016000600401&lang=pt.