

ANA CAROLINA JUNQUEIRA MOURA

**AVALIAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL E DO
XENODIAGNÓSTICO DE CÃES COM ANTICORPOS ANTI-
LEISHMANIA E DE CÃES VACINADOS COM LEISHMUNE[®],
PROVENIENTES DE ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Clínica e Cirurgia Veterinárias.

Orientadora: Prof^ª. Fabíola de Oliveira Paes Leme

**Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2013**

Moura, Ana Carolina Junqueira, 1982-
M929a Avaliação clínico-laboratorial e do xenodiagnóstico de cães com anticorpos anti-leishmania e de cães vacinados com Leishmune®, provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral canina / Ana Carolina Junqueira Moura. – 2013.

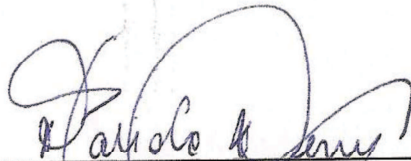
96 p. : il.

Orientador: Fabíola de Oliveira Paes Leme
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

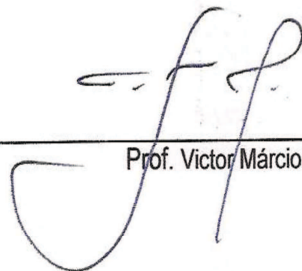
1. Cão – Doenças – Teses. 2. Leishmaniose visceral – Controle – Teses.
3. Leishmaniose visceral – Vacina – Teses. 4. Vacina veterinária – Teses. I. Leme, Fabíola de Oliveira Paes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
III. Título.

CDD – 636.708 96

Dissertação defendida e aprovada em 24 de abril de 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof.^a Fabíola de Oliveira Paes Leme
Presidente



Prof. Victor Márcio Ribeiro



Prof.^a Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho

Trabalho realizado nos Departamentos Parasitologia e Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas, no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e no Instituto de Patologia Clínica Hermes Pardini. O projeto foi financiado com recursos cedidos pelo laboratório Pfizer® Saúde Animal.

Aos queridos amigos caninos que participaram desse experimento e a tantos outros vitimados pela leishmaniose visceral, dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me iluminar e não me deixar desistir.

Aos meus pais, Eduardo e Ana Lúcia, pelo apoio e carinho incondicionais, e gostaria de pedir-lhes desculpas pelos meus vários momentos de ausência, pela correria do dia-a-dia, pelos vários compromissos e obrigações. Obrigada por me acolherem e contribuírem para o meu crescimento pessoal e profissional, por estarem do meu lado na tomada de minhas decisões. Sem vocês, não teria chegado onde estou.

Ao meu irmão, “Eduardinho”, pelo carinho e preocupação dispensados e a Marcele, pelas ajudas valiosas cedidas para a construção da dissertação.

A Dora por zelar por mim e pelos meus animais, pelo carinho e pela dedicação.

Ao meu marido, Samuel, por me apoiar em minhas escolhas, pela compreensão pelo momento conturbado enfrentado. Por não me deixar desistir frente aos desafios e, também, pela cobrança de resultados.

A Tia, Prof.^a Adriane, por confiar a mim esse trabalho desenvolvido, por contribuir para meu crescimento pessoal e profissional, por me “salvar de uma tempestade”.

A Fa, Prof.^a Fabíola, por me acolher em um momento delicado, pela disposição e prontidão em ajudar e por compartilhar seu conhecimento. Obrigada pela preocupação e carinho.

Ao Prof. Paulo, que contribuiu para meu crescimento profissional e também pessoal. Pela oportunidade de aprendizado e por compartilhar seu conhecimento.

A Eloisa, amiga, parceira de boas risadas, pela grande ajuda, por ser braço direito. Obrigada pela convivência iluminada e pelo aprendizado.

A todos os proprietários que aceitaram trabalhar conosco, pela disponibilidade em ceder gentilmente seus amigos caninos, por ajudar no desenvolvimento da pesquisa. Sem a cooperação de vocês, não teria sido possível a conclusão desse trabalho.

A equipe de policiais do Canil da Polícia Militar de Minas Gerais, representada pela Dra. Denise Jones, por nos receber de prontidão, pela grande parceria no desenvolvimento do trabalho e pela oportunidade em permitir conhecer criaturas de quatro patas fantásticas, que merecem todo o respeito e reconhecimento. Muito obrigada!

A equipe do Laboratório Pfizer[®] por confiar a execução do trabalho nas mãos da equipe da prof.^a Adriane. A Fabiana Avelar, pela consultoria e pelo auxílio na busca por pacientes com características peculiares à pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Clínica, da Escola de Veterinária, que muito me ajudaram e contribuíram para a realização desse trabalho. A Creuzinha, minha querida amiga, pelo companheirismo e dedicação, por amenizar a penosa luta. Sem você, teria sido bem mais difícil. A Renata pela amizade, por acreditar em minha capacidade, por me apoiar e por não

deixar que eu desistisse. Ao Caxito, pela disposição em ajudar e contribuir de forma desprendida e despreziosa. Sua amizade é muito valiosa para mim. A Jô, mesmo que encontrando raras vezes, me fazia rir com seus bordões. A “minha irmã”, Tina, sempre de prontidão em ajudar e a me aliviar do sufoco. As “minhas R1”, Anna e Carla, pela torcida e preocupação. Todos vocês moram em meu coração. E não há título nenhum que supere a conquista de verdadeiros amigos!

As meninas de Iniciação Científica, Joana e Vanessa, pela colaboração, empenho e interesse em trabalhar e ajudar nesse trabalho.

Aos colegas de profissão do Hospital Veterinário da UFMG, que se empenharam na busca por pacientes que se adequassem ao perfil da pesquisa. A Dra Junia, pela grande ajuda e contribuição prática. Aos colegas da Farmácia, representados pelos Sr. Ronaldo e Sr. Mércio, pelo auxílio com medicamentos e outros insumos utilizados na pesquisa. A Creide, pela atenção e pela prontidão em resolver problemas burocráticos rotineiros.

A equipe da Prof.^a Maria Norma de Melo, principalmente ao Nino, por compartilhar seu conhecimento e pela disposição em ajudar.

A equipe do Prof.^o Ricardo Tafuri, por permitir que trabalhássemos com alguns animais do biotério do ICB, e a Izabela pela disponibilidade e cooperação na realização das provas sorológicas e pelo conhecimento compartilhado.

A Rosália pela atenção e disponibilidade, e por nos auxiliar a identificar os pontos críticos na execução das provas sorológicas.

A equipe do Prof.^o Ricardo Fujiwara, pela cooperação na realização de uma das etapas do trabalho e pela disponibilidade em ajudar.

A equipe do Colegiado de Pós-Graduação, principalmente ao prof. Roberto Guedes pela compreensão às particularidades inerentes ao desenvolvimento do trabalho, e pela atenção dispensada pela Débora e Luzete.

A equipe do Instituto Hermes Pardini, representada pelo Cid e Vanessa, pela disposição e pelo interesse em contribuir para a realização do trabalho. A Mari, Cris, Cynthia e Rossana pelo auxílio na realização da qPCR, pela acessibilidade e pelo conhecimento compartilhado.

A todos vocês, minha sincera gratidão!

SUMÁRIO

RESUMO	15	
ABSTRACT	16	
INTRODUÇÃO	17	
 CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL DE CÃES COM ANTICORPOS ANTI-<i>Leishmania</i> E DE CÃES VACINADOS COM LEISHMUNE®		
1	LITERATURA CONSULTADA	20
1.1	Patogênese e sinais clínicos da LVC	20
1.2	Classificação dos animais quanto aos sinais clínicos	22
1.3	Achados de patologia clínica	22
1.3.1	Alterações no eritrograma	22
1.3.2	Alterações no leucograma	22
1.3.3	Alterações no plaquetograma	23
1.3.4	Alterações de medula óssea	23
1.3.5	Alterações bioquímicas	24
1.3.6	Disproteïnemias	24
1.4	Diagnósticos da leishmaniose visceral canina	24
1.4.1	Diagnóstico clínico	24
1.4.2	Exame parasitológico direto	25
1.4.3	Reação da Polimerase em Cadeia quantitativa ou em tempo real (qPCR)	25
2	HIPÓTESES	26
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo geral	26
3.2	Objetivos específicos	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Animais	27
4.2	Avaliação clínica	27
4.3	Coleta de material	27
4.3.1	Amostras de sangue	27
4.3.2	Amostras de medula óssea	28
4.4	Realização de hemograma	28
4.5	Realização de bioquímica sérica	28
4.6	Avaliação da medula óssea e exame parasitológico direto	28
4.7	Realização de qPCR	29
4.7.1	Extração do DNA	29
4.7.2	Amplificação do DNA	29
4.8	Análise estatística	31
5	RESULTADOS	31
5.1	Aspectos clínicos e sintomatologia de cães com anticorpos anti- <i>Leishmania</i> e de cães vacinados com Leishmune®	31
5.2	Aspectos laboratoriais de cães com anticorpos anti- <i>Leishmania</i> e de cães vacinados com Leishmune®	33
5.2.1	Hemograma	33
5.2.2	Bioquímica sérica	35
5.2.3	Exame parasitológico e avaliação da medula óssea	36

5.2.4	qPCR	37
5.2.5	Correlação entre sinais clínicos, alterações de patologia clínica e intensidade parasitária medular	38
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÕES	42

CAPÍTULO 2: XENODIAGNÓSTICO, TESTES SOROLÓGICOS DE ELISA-SLA, ELISA-FML E DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA DE MEDULA ÓSSEA DE CÃES COM ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* E DE CÃES VACINADOS COM LEISHMUNE®

1	LITERATURA CONSULTADA	44
1.1	Agente etiológico, transmissão e reservatórios da leishmaniose visceral canina	44
1.2	Vetores da LVC	45
1.3	Ciclo biológico do parasito no vetor	46
1.4	Vacina Leishmune®	48
1.5	Resposta imune contra <i>Leishmania</i> spp	49
1.6	Resposta imune em cães vacinados com Leishmune®	50
1.7	Métodos diagnósticos laboratoriais da LVC	51
1.7.1	Métodos parasitológicos	51
1.7.2	Métodos sorológicos	52
1.7.3	qPCR	53
2	HIPÓTESES	54
3	OBJETIVOS	54
3.1	Objetivo geral	54
3.2	Objetivos específicos	55
4	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1	Animais	55
4.2	Avaliação clínica	55
4.3	Vetores <i>L. longipalpis</i>	56
4.4	Xenodiagnóstico	56
4.4.1	Alimentação de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> em cães	56
4.4.2	Dissecação de fêmeas de <i>L. longipalpis</i>	58
4.5	Exames laboratoriais	58
4.5.1	Coleta de material	58
4.5.2	ELISA-SLA	59
4.5.3	ELISA-FML	59
4.6	qPCR	60
4.6.1	Extração do DNA	60
4.6.2	Amplificação do DNA	61
4.7	Análise estatística	62
5	RESULTADOS	63
5.1	Categorização clínica	63
5.2	Xenodiagnóstico	63
5.3	ELISA-SLA	65
5.4	ELISA-FML	65
5.5	qPCR	67
5.6	Correlação entre resultados para os grupos e subgrupos de CL e CV	68
6	DISCUSSÃO	68

7	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXO A	DCF	86
ANEXO B	Intervalos de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos de cães adultos	92
ANEXO C	Soluções utilizadas - ELISA	93
ANEXO D	Soluções utilizadas - qPCR	95
ANEXO E	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	96

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Relação entre as dermatopatias observadas nos cães, representadas por escores, número de cães existentes nos subgrupos CS, CO e CA de CL e CV e a percentagem de cada alteração de pele e anexo descrita por grupo	32
Tabela 2	Valores médios e desvio padrão obtidos à avaliação dos eritrograma e plaquetograma entre as categorias clínicas CS, CO e CA dos grupos CL e CV..	33
Tabela 3	Valores médios e desvio padrão obtidos à avaliação do leucograma entre as categorias clínicas CS, CO e CA dos grupos CL e CV.	34
Tabela 4	Valores médios e desvio padrão obtidos à avaliação bioquímica distribuídos entre as categorias clínicas CS, CO e Ca dos grupos CL e CV	36
Tabela 5	Quantidade média de cópias de DNA de <i>Leishmania</i> /mL de medula óssea, obtida pela técnica de qPCR, e desvio padrão distribuídos entre grupos CL e CV e seus subgrupos CS, CO e CA	38

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Média e desvio padrão da quantidade de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> dissecadas e infectadas por grupo e subgrupo de CL e CV	65
Tabela 2	Resultados médios das absorbâncias obtidas ao ELISA-SLA e ELISA-FML e desvio-padrão distribuídos entre os grupos CL e CV e os subgrupos CS, CO e CA	66
Tabela 3	Quantidade média de cópias de DNA de <i>Leishmania</i> /mL de medula óssea, obtida pela técnica de qPCR, e desvio padrão distribuídos entre grupos CL e CV e seus subgrupos CS, CO e CA.	68

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Quadro 1	Relação entre a quantidade de parasitos observados à análise de três lâminas/animal e sua representatividade quanto à intensidade parasitária e simbologia utilizada.	29
Quadro 2	Relação dos reagentes e sua quantidade utilizada no preparo da mistura contendo kDNA.	30
Quadro 3	Relação dos reagentes e sua quantidade utilizados no preparo da solução de β -actina	30
Quadro 4	Relação entre o resultado de qPCR e o número de cópias de DNA de <i>Lesihmania</i> /mL de medula óssea	31
Figura 1	Principais dermatopatias observadas em cães com anticorpos anti- <i>Leishmania</i> (CL).	32
Figura 2	Principais dermatopatias observadas em cães vacinados com Leishmune [®]	32
Figura 3	Valores médios de VG (volume globular) obtidos à avaliação do eritrograma de CL (cães com anticorpos anti- <i>Leishmania</i>) e CV (cães vacinados com Leishmune [®]). Linha púrpura representa o valor mínimo de VG (37%) considerado normal para cães adultos	34
Figura 4	Valores médios de eritrócitos obtidos à avaliação do eritrograma de CL (cães com	

	anticorpos anti- <i>Leishmania</i>) e CV (cães vacinados com Leishmune®). Linha púrpura representa o valor mínimo de eritrócitos ($5,5 \times 10^6$ cél./ μL de sangue) considerado normal para cães adultos.	35
Figura 5	Valores médios de hemoglobina obtidos à avaliação do hemograma de CL (cães com anticorpos anti- <i>Leishmania</i>) e CV (cães vacinados com Leishmune®). Linha púrpura representa valor mínimo de hemoglobina (12 g/dL).	35
Figura 6	Valores médios da concentração de PT (proteínas totais), albumina e globulina obtidos à avaliação bioquímica de CL (cães com anticorpos anti- <i>Leishmania</i>) e CV (cães vacinados com Leishmune®). Linhas púrpura, verde e amarela representam valor máximo de proteínas totais (7,5 g/dL), valor máximo de globulinas (4,4 g/dL) e mínimo de albumina (2,3 g/dL), respectivamente, para cães adultos.	35
Figura 7	Quantidade média de cópias de <i>Leishmania</i> /mL de medula óssea, obtida a qPCR de cães com anticorpos anti- <i>Leishmania</i> (CL), distribuída entre os subgrupos CS (cães sintomáticos), CO (cães oligossintomáticos), CA (cães assintomáticos).	37
Figura 8	Quantidade média de cópias de <i>Leishmania</i> /mL de medula óssea, obtida a qPCR de cães vacinados com Leishmune® (CV), distribuída entre os subgrupos CS (cães sintomáticos), CO (cães oligossintomáticos), CA (cães assintomáticos).	38
CAPÍTULO 2		
Quadro 1	Relação entre resultado do xenodiagnóstico, intensidade parasitária intestinal observada em <i>L. longipalpis</i> e simbologia utilizada para caracterizar a carga parasitária intestinal.	58
Quadro 2	Relação dos reagentes e sua quantidade utilizada no preparo da mistura contendo kDNA	62
Quadro 3	Relação dos reagentes e sua quantidade utilizados no preparo da solução de β -actina	62
Quadro 4	Relação entre o resultado de qPCR e o número de cópias de DNA de <i>Leishmania</i> /mL de medula óssea	62
Figura 1	Esquema das principais e mais pesquisadas espécies de <i>Leishmania</i> , com maior interesse e importância na Medicina. Parasitos do gênero <i>Leishmania</i> e <i>Viannia</i> infectam mamíferos, enquanto que os do <i>Sauroleishmania</i> infectam répteis.	44
Figura 2	Desenvolvimento de formas de <i>Leishmania</i> no intestino do flebotomíneo. 1- Promastigota procíclica. 2- Promastigota nectomona. 3- Promastigota haptomona. 4- Promastigota paramastigota. 5- Promastigota metacíclica.	46
Figura 3	Desenho esquemático do tubo digestivo dissecado de <i>L. longipalpis</i> , mostrando a divisão do tubo digestivo em intestino anterior, médio e posterior, separados pela linha tracejada	47
Figura 4	Miniaturas de armadilhas CDC (Center for Disease Control)	56
Figura 5	Flebocontainer, aparato utilizado para manutenção dos flebotomíneos para xenodiagnóstico nos cães em estudo, desde a alimentação até a transferência para miniaturas de armadilhas CDC (Center for Disease Control)	57
Figura 6	Exposição do animal às fêmeas de <i>L. longipalpis</i>	57
Figura 7	Materiais utilizados na dissecação de fêmeas <i>L. longipalpis</i> : (1) lâmina de microscopia, (2) lamínulas e (3) hastes de resina epóxi, com agulha em uma das extremidades	58
Figura 8	Visualização microscópica do intestino de <i>L. longipalpis</i> , alimentada em CL, evidenciando formas promastigotas metacíclicas de <i>L. infantum</i> . Em destaque, evidencia-se a presença de rosáceas, mostrando infecção elevada pelo parasito	63
Figura 9	Fotos dos morfotipos de <i>L. infantum</i> visualizados no intestino de <i>L. longipalpis</i> . A- Destaque do morfotipo visualizado em fêmea alimentada em CV (cães vacinados com Leishmune®), sendo morfologicamente semelhante à promastigota paramastigota, representada em desenho esquemático (1). Destaque do morfotipo	

	visualizado em fêmea alimentada em CS (cães com anticorpos anti- <i>Leishmania</i>), sendo morfológicamente semelhante à promastigota metacíclica, representada no desenho esquemático (2)	64
Figura 10	Valores médios de absorbância obtidos à avaliação do ELISA-SLA para os grupos CL (cães com anticorpos anti- <i>Leishmania</i>) e CV (cães vacinados com Leishmune®), divididos entre os subgrupos CS (cães sintomáticos), CO (cães oligossintomáticos) e CA (cães assintomáticos)	65
Figura 11	Valores médios de absorbância obtidos à avaliação do ELISA-FML para os grupos CL (cães com anticorpos anti- <i>Leishmania</i>) e CV (cães vacinados com Leishmune®), distribuídos entre os subgrupos CS(cães sintomáticos), CO (cães oligossintomáticos) e CA (cães assintomáticos)	66
Figura 12	Quantidade média de cópias de <i>Leishmania</i> /mL de medula óssea, obtida a qPCR de cães com anticorpos anti- <i>Leishmania</i> (CL), distribuída entre os subgrupos CS (cães sintomáticos), CO (cães oligossintomáticos), CA (cães assintomáticos)	67
Figura 13	Quantidade média de cópias de <i>Leishmania</i> /mL de medula óssea, obtida a Qpcr de cães vacinados com Leishmune® (CV), distribuída entre os subgrupos CS (cães sintomáticos), CO (cães oligossintomáticos), CA (cães assintomáticos)	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
A	Albumina
ALT	Alaninoaminotransferase
AST	Aspartatoaminotransferase
CA	Cães assintomáticos
CCZ	Centro de Controle de Zoonozes
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	Center for Disease Control
cél.	Células
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CHCM	Concentração de hemoglobina globular média
CL	Cães com anticorpos anti- <i>Leishmania</i>
CO	Cães oligossintomáticos
cPCR	Reação em Cadeia da Polimerase convencional
CS	Cães sintomáticos
CV	Cães vacinados
DCF	<i>Data Capture Form</i>
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Lynked Immunosorbent Assay</i>
fL	Fentolitro
FML	Fucosemanose-ligante
G	Globulina
g	Gramma
HE	Hematoxilina-eosina
IgG	Imunoglobulina da classe G

IgG1	Imunoglobulina da subclasse G1
IgG2	Imunoglobulina da subclasse G2
IgG3	Imunoglobulina da subclasse G3
IgG4	Imunoglobulina da subclasse G4
IgGE	Imunoglobulina da classe E
IgM	Imunoglobulina da classe M
IHQ	Imunoistoquímica
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon gama
Kg	Kilograma
L _T	Linfócitos T
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MDS	Síndrome mielodisplásica
M:E	Mielóide:eritróide
mg	Miligrama
mL	Mililitro
OMS	Organização Mundial de Saúde
pmol	Picomol
PBS	Tampão Salina Fosfatada
PSG	<i>Promastigote Secretory Gel</i>
PVC	Policloreto de vinila
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
ROC	Curvas Características de Operação do Receptor
(curva)	
rpm	Rotações por minuto
SD	Desvio padrão
SLA	Antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>
TE	Tampão eluição
TGF- β ,	Fator de Transformação de Crescimento beta
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UI	Unidades Internacionais
VCM	Volume Corpuscular Médio
VG	Volume globular
WHO	<i>World Health Organization</i>
X	Média

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença grave, ainda negligenciada nos países em desenvolvimento. O cão é o principal reservatório doméstico do parasito e alvo estratégico no controle da doença. O desenvolvimento de vacinas bem como suas propriedades têm sido exaustivamente pesquisados. Nesse estudo, 33 cães com anticorpos anti-*Leishmania* e 46 vacinados com Leishmune[®] foram avaliados clinicamente e categorizados quanto à presença de sinais clínicos. Os achados clínico-laboratoriais foram comparados entre os grupos e subgrupos. Animais vacinados com Leishmune[®] não apresentaram alterações hematológicas e bioquímicas, ao passo que 81,8% dos infectados apresentaram anemia normocítica normocrômica, além de disproteinemias, caracterizadas principalmente pela redução da relação A/G. Apenas 33,3% e 36,9% dos vacinados apresentaram resultados positivos ao xenodiagnóstico e a qPCR, respectivamente, contra 68,7% e 93,9% dos cães com anticorpos anti-*Leishmania*. Cães vacinados tiveram em média 916,2 cópias de DNA de *Leishmania*/mL de medula óssea e os com anticorpos, 78.752.966,92 cópias. Cães vacinados apresentaram teores mais elevados de anticorpos IgG quando comparados, mas não ao ELISA-FML. Constatou-se que a vacina Leishmune[®] foi capaz de reduzir a infecção de flebotomíneos alimentados em cães imunizados, além de diminuir a carga parasitária medular, constituindo importante ferramenta na redução da morbidade e propagação da doença.

Palavras-chave: leishmaniose visceral canina, Leishmune[®], xenodiagnóstico, qPCR, hemograma, bioquímica sérica.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a severe disease, but still neglected in under developing countries. Dogs are its principal reservoir, as well as a strategic target in the disease control. The development of vaccines and the study of its properties have been the focus of several and exhaustive researches. In the present studies, 33 dogs with anti-*Leishmania* and 46 vaccinated with Leishmune®, were clinically examined, and categorized according to their clinical signs. According to their clinical and laboratorial findings, dogs were divided in sub groups. Leishmune® vaccinated animals showed no alterations on the hematological or biochemical profiles, as naturally 81,8% of the infected dogs showed normocytic/normochromic anemia, besides dysproteinemias, mainly characterized as reduction A/G relation. Only 33,3% and 36,9% of vaccinated dogs demonstrated positive results in xenodiagnoses and qPCR examinations, while these results were 68,7% and 93,9% in the dogs with anti-*Leishmania* group. When analyzing bone marrow qPCR studies, vaccinated positive dogs showed only 916,2 copies/mL of *Leishmania* DNA, while these results were 78.752.966,92 copies/mL in dogs with anti-*Leishmania*. Regarding IgG ELISA study, there was significant difference between groups when *Leishmania* soluble antigen was used, but not with FML antigen. It was demonstrated that the use Leishmune® was able to reduce sand flies infection, as well as bone marrow parasite load, and can be used as an important tool in the reduction of the disease morbidity and spreading.

Key words: canine visceral leishmaniasis, Leishmune®, xenodiagnoses, qPCR, haemogram, profile biochemical.

INTRODUÇÃO

O gênero *Leishmania* abriga um grande número de espécies, das quais cerca de 22 são causadoras de afecções cutâneas ou viscerais em seres humanos, sendo as últimas lesões graves, se tornando fatal quando não tratada (Ashford, 2000).

As leishmanioses estão presentes em 88 países, dos quais 72 são considerados em desenvolvimento. Dos casos registrados na América Latina, cerca de 90% deles pertencem ao Brasil (Brasil, 2010).

Segundo a Organização mundial de Saúde (WHO, 2010), a leishmaniose é uma das doenças tropicais mais negligenciadas, com mais de 12 milhões de pessoas infectadas em todo mundo e dois milhões de novos casos registrados a cada ano. Cerca de 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de se infectarem e o número de novos casos documentados é cada vez maior. É ainda considerada uma das seis doenças endêmicas de maior importância no mundo (Brasil, 2010)

A leishmaniose visceral (LV) apresenta amplo espectro epidemiológico no mundo, ocorrendo em áreas tropicais e subtropicais, podendo ser causada pelas espécies *Leishmania (Leishmania) donovani* no velho mundo e *L. (L.) infantum/chagasi* no novo mundo (Kaye e Aebischer, 2011), que estão agrupadas no complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*. (WHO, 2011).

A ocorrência da doença em dada área depende da presença do vetor e de reservatório/hospedeiro susceptível. A principal forma de transmissão do parasito para o homem e para outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas infectadas de dípteros da família Phlebotomidae, subfamília Phlebotominae. A *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, espécie de hábitos alimentares oportunistas, é a

principal espécie transmissora na América (Dias et al., 2003). A transmissão vertical transplacentária (Masucci et al., 2003) e a venérea (Benites et al., 2011) têm sido apontadas como possíveis formas de transmissão da doença em cães, além da transfusional Gállego, 2004; De Freitas et al., 2006).

Em 2008, foram registrados casos da doença em 20 estados de quatro regiões brasileiras, com expansão gradativa para regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste, que passaram de 17% do total de casos em 2000, para 48% em 2008. Os municípios com maiores relatos de ocorrência da LV foram Campo Grande (MS), Fortaleza (CE) e Belo Horizonte (MG). Apesar da região Nordeste concentrar maior registro de casos da LV, o número vem decrescendo desde 2000, passando de 83% para 45% em 2008 (Brasil, 2010).

Os cães são considerados os principais reservatórios do parasito causador da LV no velho e novo mundo, quando se considera a forma zoonótica da doença (Moreno e Alvar, 2002), embora esse papel tenha sido contestado, já que o homem também é tido como reservatório de parasito no Brasil (Costa, 1997). Os cães são considerados os principais responsáveis pela manutenção do parasito nos focos endêmicos, particularmente pela presença de animais assintomáticos (Costa, 2008), sendo um dos alvos estratégicos de controle da doença (WHO, 2011).

As fêmeas de *L. longipalpis*, ao realizarem repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, ingerem formas amastigotas, que se transformam em formas promastigotas. Essas sofrem transformações ao longo dos intestinos do flebotomíneo, por meio da metaciclogênese, até se transformarem em promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes. Desta forma, ao realizarem novo repasto, as

fêmeas regurgitam as formas infectantes na pele do hospedeiro (Cunningham, 2002 citado por Saraiva et al., 2006), completando o ciclo heteroxeno da doença.

Visando o controle da LV a OMS recomenda a eutanásia dos cães com diagnóstico sorológico ou parasitológico positivo, associada ao tratamento dos casos humanos e combate ao vetor, embora reconheça as limitações do primeiro procedimento (WHO, 1990; Brasil, 2010).

O controle do cão portador de LV no Brasil, segundo Barbiéri (2006) está atualmente fundamentado no tratamento e eutanásia. O tratamento tem demonstrado baixa eficácia com drogas utilizadas em humanos, enquanto a eutanásia é pouco aceita por razões éticas e sociais. Considerando que as medidas de controle centradas no cão têm se mostrado inconsistentes, o desenvolvimento de vacinas contra a LV tem sido prioridade e considerado medida urgente pela OMS (Da Silva et al., 2001; Barbieri, 2006).

A imunidade duradoura contra LV e casos de toxicidade e resistência relatados com uso de medicamentos em humanos têm motivado o desenvolvimento de vacinas contra a doença. As vacinas podem ser classificadas como sendo de primeira, segunda e de terceira geração (Nagill e Kaur; Das e Ali, 2012). As vacinas de primeira geração utilizam parasitos mortos de *Leishmania* spp. ou atenuados, por meio de técnicas de irradiação gama (River et al., 1993), variações de temperatura (Mitchell et al., 1984) e químicas (Kimsey et al., 1993). Essas vacinas fornecem a vantagem de levar à mimetização do curso natural de infecção, induzindo proteção duradoura, porém podem levar à reversão da virulência, ou reativação em indivíduos imunossuprimidos (Silvestre et al., 2008). As de segunda geração utilizam frações purificadas, de forma parcial ou total, de parasitos de *Leishmania* spp. (Palatinik-de-

Sousa et al., 1989), como a Leishmune® (Pfizer, Brasil). Esta consiste em uma fração glicoprotéica purificada, contendo um ligante de fucose e manose (FML), presente na superfície de membrana do parasito (Lima et al., 2006). A fração FML é considerada muito imunogênica para cães e em estudos realizados por Da Silva et al. (2001), ficou evidente que a vacinação com FML associado à saponina como adjuvante, foi capaz de induzir 97% de soropositividade para a fração em cães. As vacinas de terceira geração, ou de DNA, são produzidas por meio de modificações genéticas, através da inserção de um gene de interesse de *Leishmania* spp. em plasmídeo, capaz de induzir resposta celular tipo Th-1 duradoura (Gurunathan et al., 2000).

Cães acometidos pela LV tendem a desenvolver sinais viscerocutâneos, cuja gravidade correlaciona-se ao tipo de resposta imunológica desenvolvida e do sistema acometido. (Trotz-Williams e Gradoni, 2003). Dentre os sinais clínicos mais observados estão: dermatopatias (Palis et al., 2007; Sollano-Galego et al., 2009), linfadenopatias (Costa-Val et al., 2007), emagrecimento (Reis et al., 2006a) e como alterações laboratoriais são descritas principalmente: anemia normocítica normocrômica (Reis et al., 2006a; Costa-Val, et al., 2007; Aguiar et al., 2007; Paludo et al., 2007; Silva, 2007; Caminha e Sotoblanco, 2008), disproteinemias (Paludo et al., 2007; Castro et al., 2012; De Freitas et al., 2012) e azotemia (Paludo et al., 2007; De Freitas et al., 2012). Cães infectados tendem a apresentar grau de parasitismo de órgãos linfóides de moderado a intenso (Reis et al., 2006a; Tropia de Abreu et al., 2011) e apresentam elevada capacidade de infecção de flebotomíneos (Costa-Val et al., 2007). Os elevados níveis de anticorpos contra *Leishmania chagasi*. (Quinell et al., 2001) permitem o diagnóstico da doença baseadas em técnicas sorológicas.

Comparativamente aos animais com anticorpos anti-*Leishmania*, apenas pequena parcela de cães vacinados com Leishmune[®], se infectados, pode mostrar sinais discretos de LV (Da silva et al., 2001), ou permanecer assintomáticos, após alguns anos do início do esquema de vacinação (De Amorim et al., 2010). Cães vacinados também apresentam menor potencial em infectar flebotomíneos (Nogueira et al., 2005; Saraiva et al., 2006), e estudos demonstraram ausência de parasitos na pele, através de técnicas imunoistoquímicas e em linfonodos e sangue total, através de realização de Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) (Saraiva et al., 2006; De Amorim et al., 2010).

CAPÍTULO 1

ASPECTOS CLÍNICO-LABORATORIAIS DE CÃES COM ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* E DE CÃES VACINADOS COM LEISHMUNE®

1- LITERATURA CONSULTADA

1.1 Patogênese e sinais clínicos da leishmaniose visceral canina (LVC)

A LVC se manifesta sob diferentes formas clínicas (De Freitas et al., 2012), compreendendo sinais viscerocutâneos (Foglia-Manzillo et al., 2006), levando o animal à morte na grande maioria dos casos (Reis et al., 2006a).

O quadro clínico desenvolvido pelo animal é amplo e depende da resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro vertebrado e da cepa do parasito inoculado durante a picada do vetor (Grima, 2005). A resposta imunológica envolve a atividade dos linfócitos T e macrófagos e o perfil de produção de citocinas por linfócitos T *helper* (Th) CD4+. Dessa forma, o animal pode estabelecer resposta do tipo Th1 ou Th2 frente ao parasito. As células Th1 produzem IL-2 (interleucina-2), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e INF- γ (interferon gama), resultando na ativação de macrófagos e conferindo resistência à infecção. Em contraste, células do tipo Th2, que produzem IL-4, IL-5 e IL-10, estimulam uma resposta de linfócitos B que inibe a resposta celular protetora, tornando o hospedeiro susceptível à progressão da doença (Barbiéri, 2006).

A ocorrência de determinados sinais clínicos e/ou sua gravidade, podem ser relacionados ao grupo clínico ao qual o animal se enquadra. Animais sintomáticos tendem a apresentar comprometimento de vários órgãos, como pele e anexos, fígado, baço, linfonodos, além de exibirem condição clínica ruim ou reservada, com emagrecimento e caquexia. Os

oligossintomáticos apresentam menos alterações e estado clínico menos comprometido, quando comparado aos sintomáticos. Já os assintomáticos apresentam-se clinicamente saudáveis (Mancianti et al., 1989; Assis et al., 2010).

No período inicial da infecção, os animais apresentam uma síndrome geral inespecífica, que pode passar despercebida, ou até mesmo, ser confundida com outras enfermidades (Grima, 2005). Esses sinais incluem apatia, emagrecimento progressivo, hiporexia ou anorexia, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia e hipertermia (Feitosa et al., 2000). A linfadenomegalia representa uma das alterações mais comuns (Costa-Val, et al., 2007; Travi et al., 2009) causada por uma proliferação intensa de linfócitos B, histiócitos e macrófagos em resposta à presença do parasito (Ciaramella e Corona, 2003). Durante a LV, linfócitos B migram de sítios periféricos para órgãos linfóides, ativando e diferenciando-se em plasmócitos, ocorrendo atividade policlonal, levando ao aumento de produção de anticorpos anti *Leishmania* (Reis et al., 2006a).

As alterações dermatológicas podem estar presentes em mais de 50% dos animais infectados (Alvar et al., 2004; Travi et al., 2009) e são de variável caracterização e extensão (Baneth, 2006). Animais com alterações de pele, normalmente apresentam acometimento sistêmico, que surge anteriormente às manifestações cutâneas (Feitosa, 2006). É comum observar áreas de rarefação pilosa e alopecia, associadas ou não à ocorrência de úlceras cutâneas (Feitosa et al., 2000; Travi et al., 2009). Em locais de tuberosidades ósseas, podem-se observar tanto hiperqueratose e lignificação

como áreas ulceradas, às quais estão, frequentemente, relacionadas à ação direta do parasito ou à vasculite necrosante, causada pela deposição de imunocomplexos (Ciaramella et al., 1997). Alguns cães apresentam despigmentação cutânea, principalmente no plano nasal. A onicogribose é um achado relativamente comum (Paludo et al., 2007; De Lima et al., 2010) e é causada pela presença do parasito estimulando a matriz ungueal (Feitosa et al., 2000).

Alterações renais, como glomerulonefrite proliferativa e nefrite intersticial, são observadas em animais com LV, decorrentes da deposição de imunocomplexos ao longo da membrana basal glomerular e tubular, podendo levar à insuficiência renal, sendo essa a principal *causa mortis* dos animais doentes. O aumento de volume de órgãos linfóides, como linfonodos, baço e fígado está associado ao estímulo e proliferação de linfócitos B, plasmócitos e histiócitos e macrófagos, bem como à multiplicação do parasito nestes últimos. Alguns animais podem apresentar diarreia crônica com sangue, pela presença de úlceras na mucosa gástrica e intestinal. A enterite pode ser resultado de um dano parasitário direto ou consequência de uma insuficiência renal (Ciaramella e Corona, 2003).

Alterações oftálmicas também são relatadas, ocorrendo em associação a sinais sistêmicos da doença. Dentre elas, são relatadas blefaroconjuntivite, ceratoconjuntivite seca, uveíte, conjuntivite folicular e membranosa e panoftalmite. Elas ocorrem, principalmente, pela deposição de complexos imunes circulantes na parede dos vasos, resultando em vasculite. Os exames histopatológicos do trato uveal, revelam infiltrado linfo-histio-plasmocitário perivascular, além da observação de formas amastigotas (Garcia-Allonso et al., 1996 citado por Luvizotto, 2006).

Muitas alterações reprodutivas em cães podem estar associadas à LV. Machos, geralmente, não manifestam alterações macroscópicas testiculares, entretanto, observam-se alterações inflamatórias, cujas intensidade e frequência estão associadas às manifestações clínicas, além da carga parasitária testicular, podendo levar à degeneração do epitélio seminífero (Diniz et al., 2005). Além disso, pode-se notar pobre qualidade seminal, com hipoproteinemia e hipomotilidade de espermatozoides (Lábat et al., 2010). Cadelas infectadas podem apresentar inflamação vaginal e vulvar, caracterizada por infiltrado linfo-histio-plasmocitário, sendo possível identificar formas do parasito no útero por técnicas imunohistoquímicas. Fêmeas prenhes, soropositivas podem apresentar placentite, histopatologicamente caracterizada por infiltrado leucocitário misto, necrose, além da presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. (Oliveira et al., 2012).

O depósito de imunocomplexos nas articulações pode levar a poliartrite, sendo possível, em raros casos, a identificação de formas do parasito no líquido sinovial. Problemas locomotores estão associados também a sinovite, osteomielite, fissuras nos coxins, úlceras interdigitais (Luvizotto, 2006), onicogribose e atrofia muscular (Aguar et al., 2007).

Alguns sinais neurológicos já foram descritos em animais acometidos pela LV, como convulsões, mioclonia, lesões em pares de nervos cranianos, levando à ptose facial, disfagia, estrabismo, andar em círculos, decorrentes de depósitos de imunocomplexos ou de infecções oportunistas no sistema nervoso central (Ciaramella e Corona, 2003; Feitosa et al., 2005). O líquido cefalorraquidiano coletado em animais infectados difere em alguns aspectos entre aqueles manifestando sinais neurológicos daqueles assintomáticos. Animais sintomáticos apresentam líquido

com aspecto turvo ou discretamente turvo, contagem de células nucleadas moderadamente aumentada, sendo possível detectar presença de IgG em mais de 60% dos animais. Em contrapartida, o líquido proveniente de animais com ausência de manifestações neurológicas apresentam aspecto e coloração normais, bem como contagem de células nucleadas dentro do intervalo de referência para a espécie (Feitosa et al., 2005).

1.2 Classificação dos animais quanto aos sinais clínicos

De acordo com os sinais clínicos apresentados, alguns pesquisadores classificam os cães em três categorias: animais assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Os assintomáticos não apresentam evidência de quaisquer sinais clínicos compatíveis com LVC. Os Oligossintomáticos possuem pelo menos um sinal típico e os sintomáticos possuem acima de três achados clínicos compatíveis com LVC (Mancianti et al., 1989; Reis et al., 2006a).

Outros pesquisadores, entretanto, optam por classificar animais portadores de *Leishmania* spp. em dois subgrupos, de acordo com alterações clínico-patológicas observadas: os com infecção clínica e os com infecção subclínica. Em ambos os grupos, os animais apresentam sorologia positiva para leishmaniose, mas naquele evidenciam-se tanto alterações clínicas quanto laboratoriais (perfil hematológico e bioquímico), enquanto nesse, não há evidência de quaisquer alterações, sendo considerados animais saudáveis tanto por parâmetros clínicos quanto laboratoriais (Solano-Gallego, 2009; De Freitas, 2012).

É possível, ainda, classificar os animais infectados em outras quatro categorias, com objetivo de se avaliar a melhor terapia a ser empregada em cada caso, além de se determinar o prognóstico, baseando-se no

status sorológico, sinais clínicos e achados de patologia clínica. Dessa forma, estadiam-se os animais em: estágio I, com doença discreta; estágio II, com doença moderada; estágio III, com doença grave e o estágio IV, com doença muito grave (Sollano-Gallego, 2009).

1.3 Achados de patologia clínica

1.3.1- Alterações no eritograma

A redução na quantidade de eritrócitos, e/ou no valor de volume globular, e/ou na concentração de hemoglobina representa um achado laboratorial comumente evidenciado em cães com LV, caracterizando, na maioria dos casos, anemia normocítica e normocrômica. Cerca de 40 a 90% dos animais infectados podem se apresentar anêmicos (Reis et al., 2006a; Costa-Val, et al., 2007; Aguiar et al., 2007; Paludo et al., 2007; Silva, 2007; Caminha e Sotto-Blanco, 2008), sendo que o grau de anemia pode ser considerado como um importante marcador da gravidade da doença (Travi et al., 2009).

Segundo a literatura, a ocorrência de anemia pode ser atribuída a diversos fatores, incluindo baixos níveis séricos de eritropoetina, doença inflamatória crônica, deficiências nutricionais, perda de sangue por ulcerações em mucosa nasal, do trato gastrointestinal (Feitosa, 2006), além de hipoplasia ou aplasia medular (Aguiar et al., 2007). Em alguns casos, a anemia pode ser atribuída a mecanismos imunomediados (Reis et al., 2006a), levando à destruição dos eritrócitos.

1.3.2- Alterações no leucograma

Alterações observadas no leucograma de animais acometidos pela LV são variáveis, não sendo possível observar padrão específico para a doença (Paludo et al., 2007; Silva et al., 2007).

Estudos realizados por Silva et al. (2010) mostraram que animais com sorologia positiva para LV podem apresentar tanto leucopenia quanto leucocitose, estando a primeira, entretanto, melhor representada entre os animais. Reis et al. (2006a) evidenciaram que cães sintomáticos apresentaram leucopenia e monocitopenia significativas, quando comparados ao grupo controle não infectado, além de eosinopenia e linfopenia ($p < 0,017$) significativas quando comparados a animais assintomáticos.

Por outro lado, Mattos Jr. et al. (2004) verificaram que animais soropositivos apresentaram monocitose como única alteração do leucograma e Paludo et al. (2007) detectaram linfopenia em 50% dos animais pertencentes ao grupo de infectado, sendo essa também a única alteração observada no leucograma.

Alguns pesquisadores não encontraram correlação positiva entre a sintomatologia apresentada pelos animais e a contagem global de leucócitos (Costa-Val et al., 2007; De Freitas et al., 2012).

1.3.3- Alterações do plaquetograma

Embora também não seja evidenciado um padrão quanto a contagem de plaquetas em animais com LV, a maioria dos autores relata ter observado trombocitopenia na maior parte dos animais acometidos por LV (Paludo et al., 2007; Silva et al., 2010; De Freitas et al., 2012).

Paludo e colaboradores (2007) observaram trombocitopenia em 65% dos animais avaliados, sorologicamente positivos para LV. Costa-Val e colaboradores (2007) verificaram trombocitopenia em apenas 15% dos animais com LV.

Em alguns animais naturalmente infectados, entretanto, pôde-se evidenciar trombocitose (Silva et al., 2010).

1.3.4- Alterações de medula óssea

Na avaliação microscópica da medula óssea, podem-se observar aumento da relação mielóide:eritróide (relação M:E), devido à hiperplasia mielóide e/ou hipoplasia eritróide, displasia em células das linhagens mielóide, eritróide e megacariocítica, além de eritrofagocitose (Foglia-Manzillo et al., 2006). As síndromes mielodisplásicas (MDS) são caracterizadas pela proliferação e diferenciação celulares defeituosas. Em pacientes humanos com LV, as MDS estão relacionadas ao aumento produção de TNF- α por macrófagos medulares, e de outras citocinas pró-apoptóticas. Concentrações elevadas de TNF- α , estão associadas ao aumento do dano oxidativo e redução da atividade da glutatona peroxidase formados na medula óssea, levando a alterações celulares (Salomão, et al., 1996; Kemp et al., 1999).

As alterações detectadas nas linhagens evolutivas celulares podem diferir, de acordo com os sinais clínicos observados, e com a intensidade de parasitismo medular. Dessa forma, animais sintomáticos exibem parasitismo medular mais acentuado do que os oligo ou assintomáticos (Trópia de Abreu et al., 2011).

A concentração de depósitos de ferro, identificados à microscopia óptica, pode estar aumentada, sendo possível identificar macrófagos repletos de hemossiderina. O acúmulo de ferro não utilizado na eritropoiese contribui para a fisiopatogenia da anemia, que frequentemente ocorre no desenvolvimento da LV (Luvisotto, 2006).

Taxa anormalmente aumentada de figuras de eritrofagocitose pode ser evidenciada à avaliação citológica medular, sendo atribuída a maior atividade fagocítica de macrófagos na tentativa de eliminar formas parasitárias de *Leishmania* do órgão, em

estímulo à produção de citocinas por linfócitos T (Foglia-Manzillo et al., 2006).

Em estudo desenvolvido por Trópia de Abreu et al. (2011) a maioria das alterações ocorridas na medula óssea foram observadas no grupo de animais cujo parasitismo medular era intenso. Essas alterações incluíam diminuição de rubrículos ortocromáticos, aumento da proliferação de células da linhagem neutrofílica e redução da linhagem precursora eosinofílica, linfocitose e plasmocitose.

Foglia-Manzillo e colaboradores (2006) verificaram que em mais de 60% dos animais naturalmente acometidos pela LV, ocorreu displasia megacariocítica, sendo os principais achados relacionados à emperipolese megacariocítica, desorganização e extrusão nucleares. Os autores também detectaram displasia eritróide, caracterizada por mitoses atípicas em eritroblastos, células multinucleadas e assincronias nuclear e citoplasmática.

1.3.5- Alterações bioquímicas

Em cães acometidos por LV, pode-se observar aumento da concentração sérica de uréia, acompanhado ou não do aumento da concentração de creatinina (Paludo et al., 2007; De Freitas et al., 2012). De maneira geral, não se nota aumento das atividades enzimáticas hepáticas, como AST (Aspartato Aminotransaminase) e ALT (Alanino aminotransferase), considerando-se a média dos animais infectados (Paludo et al., 2007; Castro et al., 2012; De Freitas et al., 2012). Entretanto, ao se avaliar isoladamente um grupo de animais, principalmente os sintomáticos, pode-se observar aumento de atividade de ALT (De Freitas, et al., 2012).

1.3.6- Disproteïnemias

Freqüentemente pode-se observar hiperproteïnemia em cães com LV, caracterizada pelo aumento da concentração de globulinas (hiperglobulinemia) e redução da concentração de albuminas (hipoalbuminemia). Conseqüentemente, a relação albumina:globulina apresenta-se abaixo do intervalo normal considerado para a espécie (Reis et al., 2006a; Paludo et al., 2007; Freitas et al., 2006; Silva et al., 2010; Castro et al., 2012). A hiperproteïnemia tende a ser mais freqüente em animais sintomáticos do que os oligo ou assintomáticos, estando presente em cerca de 50 a 70% dos animais (De Freitas et al., 2012; Castro et al., 2012).

A hiperglobulinemia observada em cães com LV ocorre principalmente devido ao aumento da fração gama. O aumento das gama-globulinas relaciona-se ao aumento de produção policlonal de anticorpos IgG, (IgG1 e IgG2) e IgE, comumente observada em cães com LV (Almeida et al., 2005).

1.4 Diagnósticos da leishmaniose visceral canina

1.4.1- Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da LV é extremamente desafiador, principalmente em se tratando de áreas endêmicas, devido às manifestações clínicas da doença, que não são específicas, podendo ser confundidas com outras enfermidades, além da presença de animais com sorologia positiva, mas com ausência de sinais clínicos (Gradoni, 2002; Francino et al., 2006). Cães infectados podem permanecer assintomáticos por longos períodos, ou por toda vida, ou manifestar sinais da doença após períodos variáveis que podem ser de três meses a anos, o que dificulta ainda mais o diagnóstico (Ferrer, 2002).

Dessa forma, o diagnóstico clínico deve estar associado a métodos diagnósticos laboratoriais, como os parasitológicos, sorológicos e moleculares (Alvar et al., 2004).

1.4.2 Exame parasitológico direto

O exame parasitológico direto é tido por alguns autores como “padrão ouro” no diagnóstico definitivo da LV (Gradoni, 2002; Barrouin-Melo et al., 2006; Machado et al., 2006). Formas amastigotas do parasito podem ser observadas em *squash* de material obtido de medula óssea, linfonodo, aspirado esplênico, corados por métodos de rotina, como os corantes do tipo Romanowsky. O método apresenta especificidade de 100% e sensibilidade variando de 60% (Gradoni, 2002) a, no máximo, 80%, dependendo da intensidade parasitária, do material coletado e do tempo dedicado para leitura da lâmina (Brasil, 2006). Apesar da alta especificidade, o método apresenta pequena sensibilidade, em torno de 60% (Gradoni, 2002), principalmente se tratando de animais assintomáticos que, de maneira geral, apresentam menor intensidade parasitária tecidual (Moreira et al., 2007; Trópia de Abreu et al., 2011). Em alguns casos, a visualização do parasito se torna muito laboriosa, não sendo incomum a detecção de amostras negativas, principalmente nos casos de doença crônica (Ikeda-Garcia et al., 2006), ou quando o tecido analisado apresenta baixa carga parasitária (Tafari et al., 2003). Tasca et al. (2009) obtiveram 64,7% de sensibilidade em testes parasitológicos de animais infectados, utilizando o baço como amostra.

A avaliação parasitológica da medula óssea representa um bom marcador para se determinar o estado clínico do animal com LV, já que tende a fornecer correlação positiva entre a densidade parasitária e a quantidade de sinais clínicos observados, quando comparada à avaliação de outros

órgãos, como linfonodos, baço, pele e fígado (Reis et al., 2006a; Trópia de Abreu et al., 2011).

A densidade parasitária da medula óssea também pode ser correlacionada à intensidade de alterações observadas no hemograma, de forma que animais com parasitismo elevado mostram moderada a acentuada anemia e leucopenia, associadas à disfunção do referido órgão (Reis et al., 2006b).

1.4.3 Reação da Polimerase em Cadeia quantitativa ou em tempo real (qPCR)

Os métodos empregando tecnologia biomolecular, de modo geral, são utilizados amplamente no diagnóstico de casos suspeitos de LV, ou não elucidados por outras metodologias (Moreira et al., 2007; Tasca et al., 2009; Assis et al., 2010; De Queiroz et al., 2010; Ramos et al., 2012).

A qPCR tem sua utilização cada vez maior, não somente por possibilitar a detecção do parasito, mas também, por quantificar o parasitismo, sendo útil no acompanhamento do desenvolvimento e evolução da doença (Quaresma et al., 2009), na avaliação da parasitemia pós tratamento, além de auxiliar no desenvolvimento de novas drogas (Francino et al., 2006; Martínez et al., 2011).

Com essa técnica, é possível identificar animais verdadeiramente infectados por *Leishmania* spp., independentemente do seu estado clínico, diferentemente do que ocorre em testes sorológicos e parasitológicos diretos, cujos resultados positivos tendem a apresentar correlação com sinais clínicos apresentados pelos animais (Quaresma et al., 2009).

Amostras obtidas de vários tecidos podem ser analisadas, sob diferentes protocolos, sendo aspirados de linfonodo e medula

óssea os que apresentam maior sensibilidade diagnóstica, principalmente na detecção de animais infectados, com ausência de sinais clínicos da doença (Moreira et al., 2007). Alguns autores recomendam a utilização de sangue total para diagnóstico molecular, sendo a coleta considerada menos invasiva em comparação à coleta de medula óssea (Assis et al., 2010). Entretanto, segundo Martínez et al. (2011), analisando comparativamente amostras de sangue total e medula óssea, provenientes de animais naturalmente infectados, é possível obter resultados positivos na qPCR com sangue total, quando a carga parasitária medular for maior que 100 a 1.000 cópias/ml. Se o parasitismo medular estiver entre 1 a 100 cópias de *Leishmania*/mL, não será possível identificar amostras de sangue total positivas, mostrando que a sensibilidade do método ao se usar sangue total está diretamente relacionada à carga parasitária presente no animal, podendo fornecer resultados falso negativos.

A técnica de PCR em tempo real se mostra uma ferramenta efetiva para diagnosticar LV nos casos em que os resultados obtidos por técnicas de ELISA se mostram inconclusivos e naqueles em que ainda não ocorreu soroconversão. Sendo assim, a qPCR apresenta alto valor preditivo positivo, permitindo identificar com grande segurança os animais verdadeiramente positivos para a doença (Martínez et al., 2011) e pode apresentar 100% de sensibilidade (Ramos et al., 2012).

Estudos desenvolvidos por Nogueira et al. (2005) revelaram ausência de infecção por *Leishmania*, através da realização de PCR de linfonodo, pele e sangue total, em todos os cães vacinados com Leishmune[®], pertencentes à área endêmica de São Paulo. Já os cães do grupo controle, não vacinados, foram detectados com infecção

através de PCR de medula óssea e sangue total, e exame parasitológico direto.

2- HIPÓTESES

Cães sorologicamente positivos para LV, provenientes de área endêmica, apresentam alterações clínico laboratoriais acentuadas, além de grande infectividade medular para *Leishmania infantum*, determinadas por métodos parasitológicos direto e qPCR.

Cães vacinados com Leishmune[®] não apresentam sinais clínicos ou alterações laboratoriais marcantes e não apresentam infectividade elevada da medula óssea para *Leishmania infantum*, determinada por métodos parasitológicos direto e qPCR.

3- OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar as alterações clínico-laboratoriais mais frequentemente observadas nos animais em estudo, comparando os achados entre cães sorologicamente positivos para LV e cães vacinados com Leishmune[®].

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a condição clínica dos cães em estudo e categorizá-los em grupos e subgrupos de acordo com a sintomatologia apresentada;
- Avaliar a condição hematológica e bioquímica dos cães em estudo, com a realização de hemograma completo e bioquímica sérica;
- Realizar pesquisa direta de amastigotas em aspirado medular, através da avaliação de *squash* corados com corante do tipo Romanowsky.

- Realizar reação da polimerase em cadeia quantitativa das amostras de medula óssea, obtidas dos cães em estudo com iniciadores específicos para *Leishmania* spp.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Setenta e nove cães, de raças variadas, de ambos os sexos, residentes em Belo Horizonte e região metropolitana foram categorizados em dois grupos de estudo: grupo 1- cães com anticorpos anti-*Leishmania* (CL) e grupo 2- cães vacinados com Leishmune[®] (CV).

Os critérios para inclusão dos cães no grupo CL foram: cães apresentando resultado sorológico reagente na técnica de ELISA e reagente 1/40 ou 1/80 na técnica de RIFI para LV, obtido de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Fundação Nacional de Saúde (Brasil, 2001). Para o grupo CV foram: cães hígidos, vacinados com Leishmune[®], em esquema inicial de três doses, com intervalo de 21 dias entre elas e reforço anual de, pelo menos, um ano, após primeira dose.

Cães apresentando alguma doença que pudesse interferir nos resultados do estudo, ou cães que tivessem sido tratados com qualquer medicamento, trinta dias antes do início do estudo, foram excluídos do grupo CV.

Todos os procedimentos com os cães foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA UFMG, processo nº 32/2011) e explicitamente permitidos pelos proprietários (ANEXO E).

Após a conclusão do estudo, todos os animais vacinados retornaram à rotina habitual. Os animais soropositivos foram

eutanasiados, tão logo a coleta de material necessário à pesquisa, seguindo as normas dispostas pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), segundo a resolução Nº 714, de 20 de junho de 2002.

Os dados referentes às informações individuais e exame clínico dos animais foram relatados em formulários específicos, chamados DCF (*Data Capture Form*) A e B (ANEXO A)

4.2 Avaliação clínica

Todos os animais foram avaliados clinicamente, atentando-se ao estado geral, à obtenção dos parâmetros vitais, como frequências cardíaca e respiratória, pulso e temperatura retal, à coloração de mucosas, à avaliação de linfonodos e às particularidades observadas por sistema acometido. Os dados referentes à avaliação clínica foram alocados em formulário próprio (DCF B), conforme ANEXO A.

Os animais foram categorizados em três subgrupos de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos observados durante o exame físico, de acordo com Mancianti et al. (1989). Dessa forma, os animais sintomáticos apresentaram mais de três sinais da doença, os oligossintomáticos até dois e os assintomáticos não apresentaram sinais clínicos.

4.3 Coleta de material

4.3.1 Amostras de sangue

Após exame clínico completo, procedeu-se a coleta de sangue da veia cefálica ou jugular. Foram coletados cerca de 4,0mL de sangue de cada animal, sendo 2,0mL acondicionados em tubos com EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) a 10%, para realização de hemograma e outros 2,0mL, em tubos sem anticoagulante, para obtenção de soro e realização de bioquímica.

4.3.2 Amostra de medula óssea

Para obtenção de amostras de medula óssea, os animais foram sedados utilizando-se acepromazina 0,2% (Acepram, Univet, Brasil) na dose de 0,05 mg/kg, associada ao citrato de fentanila a 0,05mg/mL (Fentanest, Cristalia, Brasil) na dose de 0,1mL/Kg, ambos por via intramuscular. Adicionalmente, foi realizada anestesia local do manúbrio, por infiltração anestésica com lidocaína 2% (Hipolabor, Brasil). Passados 10 minutos, introduziu-se agulha de 40X12 gauges, já acoplada à seringa de 10 ml. Uma alíquota do material medular obtido foi rapidamente transferida para lâminas de microscopia, para confecção de esfregaços por aposição, confeccionando-se três lâminas por animal. Outra alíquota foi acondicionada em frasco tipo *ependorf* de 1,5 mL e armazenada a -20°C, para realização de qPCR.

4.4 Realização de hemograma

O sangue total foi processado em analisador hematológico automático (Abacus Junior Vet, Ditatron® Group), para obtenção do valor de leucócitos totais, eritrócitos, hemoglobina e plaquetas. O valor do volume globular (VG) foi obtido pela leitura de microcapilar, após centrifugação do sangue total em microcentrífuga (Microline, Laborline). Os índices hematimétricos como volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados a partir dos valores de VG, hemoglobina e eritrócitos.

Confeccionou-se um esfregaço por amostra, corando-o com corantes hematológicos de rotina, do tipo Romanowsky. O esfregaço foi avaliado em microscópio óptico (Olympus, CH 30 - Japão), sob objetiva de imersão (x1000) para avaliação morfológica celular dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, além de contagem diferencial leucocitária, em 100 células nucleadas

contadas, sendo identificada a presença de mielócitos (Me), metamielócitos (Mt), neutrófilos bastonetes (NB.), neutrófilos segmentados (NS.), eosinófilos (Eo), basófilos (Bas), linfócitos (Lin) e monócitos (Mo).

Os intervalos de referência utilizados para o hemograma estão dispostos no ANEXO B.

4.5 Realização de bioquímica sérica

O sangue coletado em frascos sem anticoagulantes foi centrifugado após a formação do coágulo, em centrífuga (Fanem, Brasil), a 3.000 rpm por 10 minutos. O soro obtido foi alocado em frasco tipo *ependorf* e levado ao analisador automático (Cobas Mira®, Roche), para determinação de parâmetros bioquímicos, como uréia, creatinina, AST, ALT, proteínas totais, albumina (A), globulina (G) e relação A/G. Cada analito foi determinado utilizando-se kits específicos (SynerMed, EUA), seguindo a metodologia estabelecida de acordo com o fabricante. Antes da realização da rotina, utilizou-se soro controle padrão (SynerMed, EUA), para assegurar a confiabilidade dos exames.

O intervalo de referência utilizado, considerado normal para cães está disposto no ANEXO B.

4.6 Avaliação da medula óssea e exame parasitológico direto

Os esfregaços de medula óssea foram corados com corantes tipo Romanowsky e avaliados quanto ao mielograma e exame parasitológico direto. O material foi examinado em objetiva de menor aumento (x 10), para avaliar a presença de partículas, porcentagem celular, concentração de ferro e concentração de megacariócitos por partícula. Em objetiva de imersão (x 1000), foram contadas e identificadas cerca de 500 células nucleadas, para obtenção da relação

M:E, bem como para se verificar a distribuição celular.

A avaliação parasitológica foi realizada em três lâminas confeccionadas, ou até a identificação do parasito. A intensidade parasitária foi determinada através da observação da quantidade de parasitos

visualizados por campo observado em objetiva de imersão (Assis et al., 2010), como mostra o Quadro 3. Os dados relativos ao resultado parasitológico de medula óssea foram anotados no DCF-F (ANEXO A).

Quantidade de parasitos	Intensidade parasitária	Simbologia
Rara ou pouca	Discreta	+
Média	Moderada	++
Elevada	Acentuada	+++

Quadro 1- Relação entre a quantidade de parasitos observados à análise de três lâminas/animal e sua representatividade quanto à intensidade parasitária e simbologia utilizada.

4.7 Realização de qPCR

4.7.1 Extração do DNA

A extração do DNA de *Leishmania* sp. foi realizada com uso de fenol-clorofórmio. Utilizaram-se 100µL da amostra para 200µL de tampão de lise e 30 µL de solução de proteinase K 10mg/ml, que foram alocados em tubos tipo eppendorf e homogeneizados. A solução foi incubada em termobloco (Termobloco fine PCR ALB 64) a 56°C ± 2°C por uma hora. Após a digestão, o material foi incubado novamente a 95°C ± 2°C por 10 minutos, para desnaturação enzimática. Passado o tempo, o material foi centrifugado e a ele foram adicionados 300 µL de solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1. A solução foi agitada em vortex (Biomixer QL-901) por um minuto e depois centrifugada por 5 minutos a 1300 ± 200rpm. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo estéril de 2,0mL, seguindo o ciclo anteriormente citado, com solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1. O sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril de 2,0mL, contendo 300µL de solução clorofórmio:álcool isoamílico 24:1. O frasco foi agitado em vortex por um minuto e centrifugado por 5 minutos a 1300 rpm ±200rpm. O sobrenadante foi transferido para outro

frasco estéril de 2,0 mL, contendo 900µL de etanol absoluto e, à solução, foram acrescentados 30µL de solução de acetato de amônio 3M. O material foi incubado em gelo por 10 minutos, *overnight* entre -5 e -25°C. Retirado o material do gelo, o mesmo foi centrifugado por 5 minutos a 1300 ± 200rpm. O sobrenadante foi descartado e o excesso de etanol foi retirado com papel toalha. O tubo foi deixado em temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos, ou até a evaporação total do etanol. O pellet formado no tubo foi ressuscitado em 100µL de tampão eluição (TE). O tubo com o *pellet* foi incubado por alguns minutos a 60°C, para auxiliar na sua solubilização. O frasco contendo o DNA foi estocado a -70°C até a realização de sua amplificação.

As soluções utilizadas na extração do DNA estão listadas no ANEXO D.

4.7.2 Amplificação do DNA

No caso da PCR em tempo real, não há a necessidade do gel de eletroforese, uma vez que a reação ocorre em termociclador, que permite a mensuração da fluorescência na medida em que a reação ocorre, sendo essa fluorescência proporcional ao material genético amplificado. Para que isso ocorra, são empregadas sondas específicas para o

fragmento alvo, marcadas com fluoróforos. Durante a amplificação do DNA, essas sondas se ligam ao fragmento desejado, sendo inativadas enzimaticamente, ocorrendo emissão de fluorescência (Scheffe et al., 2006).

As etapas da reação foram realizadas em ambientes separados, a fim de se evitar contaminação da reação. Foram utilizados iniciadores específicos pertencentes a parasitos do gênero *Leishmania*. A mistura da reação contendo o DNA amostral foi preparada conforme os reagentes e volumes indicados no Quadro 2, totalizando o volume final de 20 μ L. A mistura contendo

β -actina foi preparada com 10 μ L de acordo com o descrito no Quadro 3, totalizando o volume final de 10 μ L. Os iniciadores utilizados para amplificação com β -actina foram: *forward* (F): 5'CTGGCACACACCTTCTACAA 3' e *reverse* (R): 5' GCCTCGGTCAGCAGCA 3'. As amostras foram analisadas em duplicata, para efeito de reprodutibilidade. A realização da PCR, bem como a determinação da sensibilidade, especificidade e linearidade do ensaio, utilizando tecnologia TaqMan foi obtida conforme descrito por Francino et al. (2006), com modificações.

Reagente	Concentração	Quantidade (μ L)
Taq Man Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, EUA)	10x	10
Assay -KND2 -ANY- Custom TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystem, EUA)	20x	1 μ L
Água milliqui	—	7 μ L
DNA genômico	—	2 μ L

Quadro 2- Relação dos reagentes e sua quantidade utilizada no preparo da mistura contendo kDNA.

Reagente	Concentração	Quantidade (μ L)
Taq Man Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, EUA)	2x	5
Primer β -actina R	10 pmol/ μ L	0,1
Primer β -actina F	10 pmol/ μ L	0,1
TaqMan MGB Probe Vic	10 pmol/ μ L	0,25
Água milliqui	—	2,55
DNA genômico	—	2

Quadro 3- Relação dos reagentes e sua quantidade utilizados no preparo da solução de β -actina.

As soluções foram distribuídas em placas MicroAmp[®] Optical (Applied Biosystems, EUA) de 96 poços, que foram seladas com selante óptico (Applied Biosystems, EUA).

As placas foram transportadas à área de automação e colocadas em termociclador StepOne Plus[®] (Applied Biosystems, EUA), para a reação. As condições ótimas para a

amplificação do DNA foram as seguintes: 50°C por dois minutos, 95°C por 10 minutos, momento no qual ocorreu crescimento exponencial do produto de PCR; e 45 ciclos intercalados de 15 segundos a 95°C e um minuto a 60°C.

Finalizada a reação, foi determinada a quantidade de cópias de DNA de

Leishmania sp/ mL de medula óssea, presentes em cada amostra, tendo-se como padrão, os resultados encontrados na curva de calibração.

Os animais dos grupos CI e CV foram categorizados de acordo com a intensidade da carga parasitária, conforme descrito no Quadro 4.

Resultado de qPCR	Cópias de DNA de <i>Leishmania</i> /mL de medula óssea
Negativo	0
Baixa positividade	0 - 100
Média positividade	100 - 1.000
Alta positividade	1.000 - 10.000
Intensa positividade	> 10.000

Quadro 4- Relação entre o resultado de qPCR e o número de cópias de DNA de *Leishmania*/mL de medula óssea (Martínez et al., 2011).

4.8 Análise estatística

Os resultados foram analisados de acordo com a natureza dos dados, sendo os não paramétricos avaliados pelos testes Mann-Whitney e Kolmogorov and Smirnov, enquanto aqueles paramétricos, pelo teste T de Student não pareado. Correlação entre alguns parâmetros também foi estabelecida, utilizando-se o método de Spearman, com intervalo de confiança de 95%. Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo programa InStat (Graphpad, Estados Unidos).

5- RESULTADOS

5.1 Aspectos clínicos e sintomatologia dos cães naturalmente infectados e dos cães vacinados

De acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos compatíveis com LV, os animais dos grupos CL e CV foram divididos em três subgrupos: sintomáticos (CS/CL e CS/CV), oligossintomáticos

(CO/CL e CO/CV) e assintomáticos (CA/CL e CA/CV).

Dos 33 animais de CL, os sintomáticos (CS/CL) representaram 63,6% (21/33), os oligossintomáticos (CO/CL) 33,3% (11/33) e os assintomáticos (CA/CL) 3,0% (1/33). Dentre os CS/CL, 43% apresentaram estado geral ruim ou regular, sendo as dermatopatias o sinal clínico mais observado, acometendo 90,5% dos animais. As dermatopatias foram divididas em escores, a fim de se detectar qual dentre elas foi mais comumente visualizada (Tab. 1). A maioria dos cães de CL apresentou associação entre as dermatopatias (Fig. 1) Outros sinais identificados em CS/CL foram: linfadenopatia (81%), seguidos por esplenomegalia (76,2%), palidez de mucosas (62%), emagrecimento (33,3%), apatia e caquexia (14,3%), hepatomegalia e ceratoconjuntivite (9,5%).

Em CO/CL, cerca de 64% apresentaram estado geral ruim, sendo os sinais clínicos mais observados: linfadenopatia (91%), dermatopatias (54,5%), palidez de mucosas

(45,5%), emagrecimento (27,3%) seguidos de esplenomegalia e caquexia (9,1%).

Não se observaram sinais clássicos da LV em nenhum cão do grupo CV. Cerca de 91% de CV não apresentaram dermatopatias (Fig. 2). Sinais sugestivos da doença foram detectados em apenas um cão (1/46 - 2,0%), sendo classificado como

sintomático (CS/CV): estado geral ruim, emagrecimento, mucosas hipocoradas e alopecia. Cerca de 37% dos cães (17/46) foram classificados como CO/CV, sendo os sinais mais comumente observados: esplenomegalia (77,8%), linfadenopatia (55,6%), dermatopatias (16,7%) e palidez de mucosas (16,7%). Os CA/CV representaram 58,6% (27/46).

Tabela 1- Relação entre as dermatopatias observadas nos cães, representadas por escores, número de cães existentes nos subgrupos CS, CO e CA de CL e CV e a percentagem de cada alteração de pele e anexo descrita por grupo.

Dermatopatias	Score	Número de CL (n=33)				Número de CV (n=46)			
		CS (n=21)	CO (n=11)	CA (n=1)	%	CS (n=1)	CO (n=18)	CA (n=27)	%
Ausentes	0	2	5	1	24,2	0	15	27	91,3
Descamação, seborréia, alopecia	1	5	0	0	15,2	1	3	0	8,7
Dermatite ulcerativa	2	2	4	0	18,2	0	0	0	0
Dermatite nodular	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Dermatite pustular	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Onicogribose	5	0	1	0	3,0	0	0	0	0
Associação entre dermatopatias	6	12	1	0	39,4	0	0	0	0

CL: cães infectados; CV: cães vacinados; CS: cães sintomáticos; CO: cães oligossintomáticos; CA: cães assintomáticos; n: número de animais.

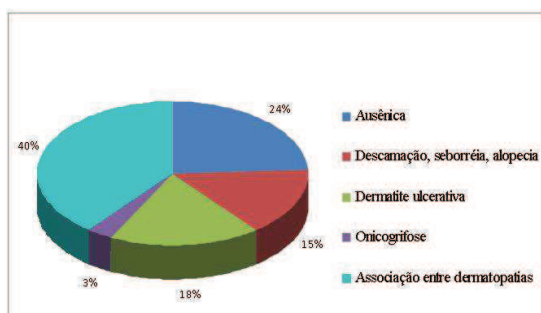


Figura 1- Principais dermatopatias observadas em cães com anticorpos anti-Leishmania (CL).

Diferenças estatísticas significativas foram observadas entre os sinais clínicos detectados em CL e CV, tais como estado geral ($p < 0,05$), emagrecimento/caquexia ($p < 0,05$), dermatopatias ($p < 0,05$), hipocromia de mucosas ($p < 0,05$) e

linfadenopatia ($p < 0,05$), sendo mais frequentemente presentes em CL.

Em relação à esplenomegalia e hepatomegalia, não foram observadas diferenças estatísticas entre CL e CV.

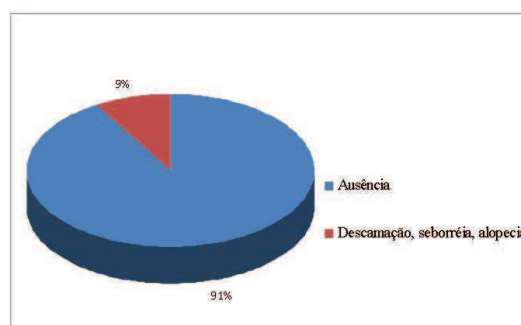


Figura 2- Principais dermatopatias observadas em cães vacinados com Leishmune®

5.2 Aspectos laboratoriais de CL e de CV

5.2.1 Hemograma

Dos animais sintomáticos pertencentes ao grupo CL, 90,5% (19/21) apresentaram valores de eritrócitos e/ou hemoglobina e/ou volume globular abaixo dos intervalos de referência considerado normal para a espécie, caracterizando anemia. Os valores médios dos índices hematimétricos obtidos como VCM e CHCM permaneceram dentro do valor considerado normal para a espécie, caracterizando anemia normocítica e normocrômica. Em média, o grupo CS/CL não apresentou outras alterações hematológicas. Entretanto, considerando os dados individualmente, foram observadas trombocitopenia e leucopenia em 52,6% (10/21) e 26,3% (5/21) dos animais. Observando-se os dados hematológicos médios do grupo CO/CL, não houve alterações, mas percebeu-se anemia, trombocitopenia e leucopenia em 54,5% (6/11), 18,1% (2/11) e 9,0% (1/11) dos

animais, respectivamente. Já o único animal alocado no grupo CA/CL apresentou anemia normocítica, normocrômica e leucopenia.

Quanto ao grupo CV, observou-se que, em média, não foram detectadas alterações ao hemograma. Contudo, considerando os achados individualmente, no grupo CA/CV, dois cães (7,4%) apresentaram anemia normocítica, normocrômica, um (3,7%) apresentou leucopenia e um (3,7%), trombocitopenia. Nos CO/CV, foram mais observadas trombocitopenia (52,6%, 10/18) anemia normocítica, normocrômica (33,3%, 6/18) e leucopenia (16,7%, 3/18). O CS/CV apresentou anemia normocítica normocrômica discreta como alteração hematológica.

As tabelas 2 e 3 correlacionam os valores médios e desvio-padrão dos índices avaliados no eritrograma/plaquetograma e leucograma de CL e CV, respectivamente

Tabela 2- Valores médios e desvio padrão obtidos à avaliação dos eritrograma e plaquetograma distribuídos entre as categorias clínicas CS, CO e CA dos grupos CL e CV.

ERITROGRAMA E PLAQUETOGRAMA						
Grupo/subgrupo	CL (n=33)			CV (n=46)		
	CS (n=21)	CO (n=11)	CA* (n=1)	CS* (n=1)	CO (n=18)	CA (n=27)
Volume Globular (%)	29,3 ^{Aa} ±8,2	37,9 ^{Bb} ±5,8	35	30	41,2 ^{Ba} ±6,5	44,8 ^{Ba} ±6,1
Hemoglobina (g/dL)	9,54 ^{Aa} ±2,8	12,6 ^{Bb} ±2,5	11,8	9,9	13,2 ^{Ba} ±2,5	15,2 ^{Ba} ±2,7
Eritrócitos (x 10 ⁶ cés/ μ L)	4,28 ^{Aa} ±1,1	5,6 ^{Bb} ±1,0	5,2	4,2	5,9 ^{Ba} ±0,7	6,2 ^{Ba} ±1,0
VCM (fL)	68,2 ^{Aa} ±5,7	68,4 ^{Aa} ±4,7	67,3	70,1	70,1 ^{Aa} ±5,1	72,4 ^{Aa} ±4,0
CHCM (g/dL)	32,5 ^{Aa} ±1,8	33,0 ^{Aa} ±2,8	33,7	32,1	32,1 ^{Aa} ±1,6	33,7 ^{Aa} ±2,2
Plaquetas (x 10 ³ / μ l)	196 ^{Aa} ±126	252 ^{Aa} ±100	130	211	193 ^{Aa} ±84	274 ^{Aa} ±120

CL: cães com anticorpos anti-*Leishmania*; CV: cães vacinados; CS: cães sintomáticos; CO: cães oligossintomáticos; CA: cães assintomáticos; n: número de animais.

Letras maiúsculas que se diferem referem-se à comparação dos subgrupos entre cada grupo, por meio do teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Letras minúsculas que se diferem se referem à comparação dos subgrupos dentro cada grupo por meio do teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

*Excluído da análise estatística pela baixa frequência (n=1)

Tabela 3- Valores médios e desvio padrão obtidos à avaliação do leucograma distribuídos entre as categorias clínicas CS, CO e CA dos grupos CL e CV.

Grupo/subgrupo	LEUCOGRAMA					
	CL (n=33)			CV (n=46)		
	CS (n=21)	CO (n=11)	CA* (n=1)	CS* (n=1)	CO (n=18)	CA (n=27)
Teste (cél/μL)						
Leucócitos totais	10.365 ^{Aa} ±5093	9.555 ^{Aa} ±2881	4.850	9.460	8.229 ^{Aa} ±2945	9.340 ^{Aa} ±2562
Mielócitos	0	0	0	0	0	0
Metamielócitos	0	0	0	0	0	0
Neutrófilos Bastonetes	91 ^{Aa} ±217	10 ^{Ab} ±34	0	0	15 ^{Ba} ±35	20 ^{Ba} ±54
Neutrófilos Segmentados	7.490 ^{Aa} ±3741	6.854 ^{Aa} ±2023	4.220	6.527	5.691 ^{Aa} ±2588	6.753 ^{Aa} ±2287
Eosinófilos	583 ^{Aa} ±736	676 ^{Aa} ±503	0	1230	442 ^{Aa} ±295	1.870 ^{Bb} ±2767
Basófilos	0	0	0	0	0	0
Linfócitos	1.742 ^{Aa} ±1174	1.610 ^{Aa} ±784	582	1.514	1.680 ^{Aa} ±803	1.418 ^{Aa} ±726
Monócitos	381 ^{Aa} ±360	380 ^{Aa} ±305	0	189	361 ^{Aa} ±177	372 ^{Aa} ±311

CL: cães com anticorpos anti-*Leishmania*; CV: cães vacinados; CS: cães sintomáticos; CO: cães oligossintomáticos; CA: cães assintomáticos; n: número de animais.

Letras maiúsculas que se diferem referem-se à comparação dos subgrupos entre cada grupo, por meio do teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Letras minúsculas que se diferem se referem à comparação dos subgrupos dentro cada grupo por meio do teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

*Excluído da análise estatística pela baixa frequência (n=1).

Considerando a média de valores obtida para VG (Fig. 3), eritrócitos (Fig. 4) e hemoglobina (Fig. 5), a diferença entre os grupos CL e CV foi significativa ($p < 0,05$), de forma que anemia foi mais frequentemente observada em CL. Quanto aos valores médios dos elementos do leucograma, como contagem global e diferencial de leucócitos, não houve diferença estatística observada entre CL e CV, assim como valores médios de plaquetas (Tab. 2).

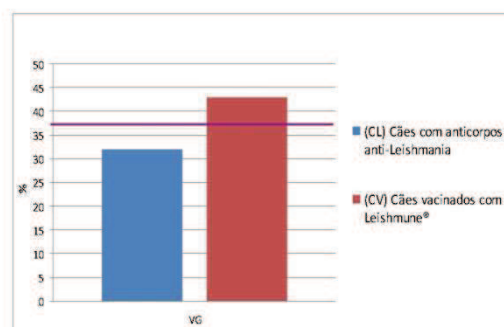


Figura 3- Valores médios de VG (volume globular) obtidos à avaliação do eritrograma de CL (cães com anticorpos anti-*Leishmania*) e CV (cães vacinados com Leishmune®). Linha púrpura representa o valor mínimo de VG (37%) considerado normal para cães adultos.

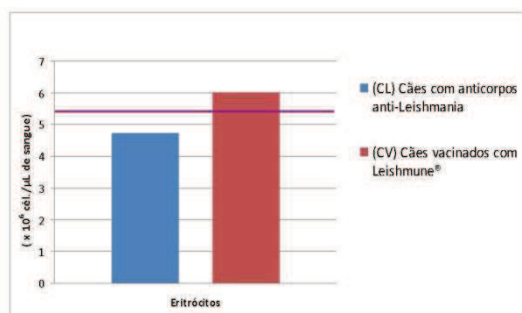


Figura 4- Valores médios de eritrócitos obtidos à avaliação do eritrograma de CL (cães com anticorpos anti-*Leishmania*) e CV (cães vacinados com Leishmune®). Linha púrpura representa o valor mínimo de eritrócitos ($5,5 \times 10^6$ cél./ μ L de sangue) considerado normal para cães adultos.

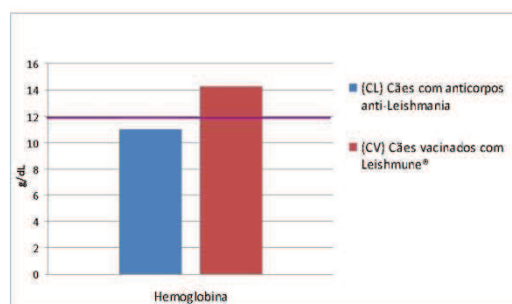


Figura 5- Valores médios de hemoglobina obtidos à avaliação do hemograma de CL (cães com anticorpos anti-*Leishmania*) e CV (cães vacinados com Leishmune®). Linha púrpura representa valor mínimo de hemoglobina (12 g/dL) considerado normal para cães adultos.

5.2.2 Bioquímica sérica

A alteração bioquímica mais frequentemente observada dentre CS/CL, CO/CL e CA/CL foi disproteinemia, sendo observada diminuição da relação A/G em 100% dos animais de CL. Considerando os valores médios, observou-se que, em CS/CL e CO/CL, houve hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e diminuição da relação A/G. A concentração média de proteína esteve discretamente aumentada em CS/CL e CA/CL.

Individualmente, no subgrupo CS/CL, 68,4% (13/21) dos animais apresentaram hiperproteinemia e hipoalbuminemia, e 94,7% (18/21), hiperglobulinemia. Nos oligossintomáticos, hiperproteinemia foi observada em 36,4% (4/11) dos animais, sendo 81,8% (9/11) e 45,5% (5/11) com hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, respectivamente. Em 81,8% (9/11) dos animais alocados nesse subgrupo foi observada relação A/G abaixo do valor esperado para a espécie.

Não foi detectada disproteinemia nos animais dos subgrupos CS/CV, CO/CV e CA/CV, considerando-se os valores médios de proteínas totais, globulina e albumina. Conseqüentemente, a relação A/G permaneceu dentro do intervalo de referência considerado normal para a espécie. A figura 6 mostra comparativamente os valores médios de PT, albumina e globulina obtidos à avaliação bioquímica de CL e CV.

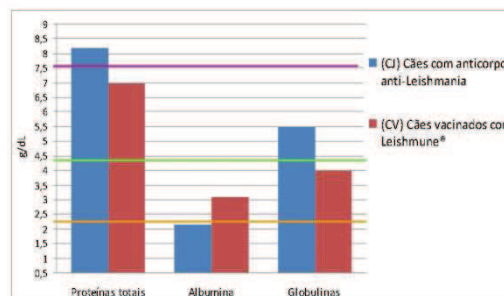


Figura 6- Valores médios da concentração de PT (proteínas totais), albumina e globulina obtidos à avaliação bioquímica de CL (cães com anticorpos anti-*Leishmania*) e CV (cães vacinados com Leishmune®). Linhas púrpura, verde e amarela representam valor máximo de proteínas totais (7,5 g/dL), valor máximo de globulinas (4,4 g/dL) e mínimo de albumina (2,3 g/dL), respectivamente, para cães adultos.

Em média, não se observou azotemia nos cães de nenhum subgrupo de CL ou CV. Mas individualmente, foi observado aumento da concentração de uréia e creatinina em 9,5% (2/21) de CS/CL.

Houve diferença significativa quanto aos valores de globulina ($p<0,05$), albumina ($p<0,05$) e relação A/G ($p<0,05$) dentre CL e CV. O valor médio encontrado para globulina e albumina entre CL foi de 5,5 g/dL e 2,14 g/dL, respectivamente, caracterizando hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, ao passo que, para CV, os valores médios foram de 4,0 g/dL e 3,1 g/dL, que são considerados normais para cães adultos.

Diante desses resultados, a relação A/G dentre os CL foi significativamente menor ($p<0,05$) do que a dos CV.

Não foi observada diferença estatística significativa entre valores de uréia e creatinina obtidos para CL e CV. Embora a atividade sérica média das enzimas AST e ALT dos grupos CL e CV estivessem dentro dos valores normais para a espécie, diferença estatística foi observada quanto ao resultado médio de AST e ALT ($p<0,05$) entre os grupos. A Tabela 3 dispõe os valores médios dos parâmetros bioquímicos obtidos em CL e CV.

Tabela 4- Valores médios e desvio padrão obtidos à avaliação bioquímica distribuídos entre as categorias clínicas CS, CO e Ca dos grupos CL e CV.

Grupo/subgrupo	BIOQUÍMICA SÉRICA					
	CL (n=33)				CV (n=46)	
	CO (n=11)	CA* (n=1)	CS* (n=1)	CO* (n=18)	CA (n=27)	CS (n=21)
Uréia (mg/dL)	44,8 ^{Aa} ±18,7	43,8 ^{Aa} ±27,9	27,4	41,9	45,0 ^{Aa} ±24,3	40,8 ^{Aa} ±13,1
Creatinina (mg/dL)	1,2 ^{Aa} ±0,5	1,2 ^{Aa} ±0,8	1,0	1,0	1,0 ^{Aa} ±0,5	1,2 ^{Aa} ±0,4
AST (U/L)	42,6 ^{Aa} ±20,4	38,6 ^{Bc} ±10,7	41,4	21,9	30,6 ^{Bb} ±6,0	34,1 ^{Bb} ±7,7
ALT (U/L)	43,5 ^{Aa} ±60,8	35,4 ^{Cb} ±60,8	23,7	26,6	41,7 ^{Aa} ±17,4	46,3 ^{Bb} ±17,5
Proteínas totais (g/dL)	7,8 ^{Aa} ±1,8	7,3 ^{Aa} ±0,9	7,7	6,7	7,3 ^{Aa} ±0,9	7,5 ^{Aa} ±1,8
Albumina (g/dL)	1,8 ^{Aa} ±0,5	2,3 ^{Bb} ±0,3	2,7	2,6	2,3 ^{Ba} ±0,3	3,2 ^{Cb} ±0,4
Globulina (g/dL)	6,0 ^{Aa} ±2,7	5,0 ^{Aa} ±1,0	5,0	4,0	4,0 ^{Bb} ±0,5	4,3 ^{Bb} ±1,5
Relação A/G	0,30 ^{Aa} ±0,2	0,50 ^{Aa} ±0,2	0,6	0,64	0,75 ^{Bb} ±0,2	0,8 ^{Bb} ±0,2

CL: cães com anticorpos anti-*Leishmania*; CV: cães vacinados; CS: cães sintomáticos; CO: cães oligossintomáticos; CA: cães assintomáticos; n: número de animais.

Letras maiúsculas que se diferem referem-se à comparação dos subgrupos entre cada grupo, por meio do teste de Mann-Whitney, com $p<0,05$.

Letras minúsculas que se diferem se referem à comparação dos subgrupos dentro cada grupo por meio do teste de Mann-Whitney, com $p<0,05$.

*Excluído da análise estatística pela baixa frequência (n=1)

5.2.3 Exame parasitológico direto e avaliação da medula óssea

O exame parasitológico direto de medula óssea revelou positividade em 75,7% (25/33) de CL, sendo a maioria deles representada pelos CS (90,5%). Em CO/CL, a positividade foi de 54,5% (6/11) Na análise da medula óssea de CA/CL, não foram visualizados parasitos. Partículas de

medula óssea estavam presentes em 78,7% dos animais do grupo CL, sendo possível estimar a celularidade e a concentração de megacariócitos apenas nessa parcela de amostras. A celularidade média foi de 70% e a concentração de megacariócitos por partícula apresentou-se aparentemente normal dentre os animais. A relação M:E apresentou-se aumentada em 72,2% dos CL, tendo como valor médio 2,62 (normal

0,90-1,76), sendo 76,2% representada por CS/CL. Foram observados alguns sinais de deseritropoiese (binucleação de rubrícitos, precursores eritróides gigantes) em dois cães, mas as células encontradas não representaram 10% do total de células nucleadas contadas, não apresentando, portanto, valor estatístico.

A avaliação citológica da medula óssea do grupo CV não pôde ser realizada em quatro animais devido à baixa qualidade da amostra. Das 42 amostras, 38 (90,4%) apresentaram-se negativas ao exame parasitológico direto, e quatro (9,5%) mostraram-se positivas para *Leishmania* spp, sendo duas de cães assintomáticos e duas de sintomáticos. Em 6 amostras do grupo CV, não foi possível estimar a relação M:E pois não havia celularidade representativa. Da parcela em que foi possível fazê-lo, a relação M:E não mostrou alteração, sendo em média normal para a espécie (1,48). A concentração de megacariócitos por partícula apresentou-se normal em 90% do grupo CV e foi possível visualizar reserva de ferro em concentração normal em 77,5% dos cães vacinados. Em um animal assintomático, foi possível visualizar figuras de eritrofagocitose em concentração aumentada, refletindo em baixo valor de eritrócitos (4,94 células $\times 10^6/\mu\text{L}$ de sangue), perceptível à realização do eritrograma.

Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre a categoria de sinais clínicos de CL e o grau de positividade à avaliação parasitológica medular, de modo que CS/CL apresentaram maior positividade ao exame.

5.2.4 qPCR

A qPCR mostrou-se positiva em 93,9% (31/33) do grupo CL, evidenciando elevado parasitismo medular, com média de 78.752.966,92 cópias de DNA de *Leishmania*/mL de medula óssea. O teste

revelou positividade em 95,2% (20/21) de CS/CL, em 91% (10/11) de CO/CL e confirmou a presença de *Leishmania* spp. no animal assintomático, em que foi possível detectar 2.495.516,36 cópias de DNA de *Leishmania*/mL de medula óssea, representando resultado de intensa positividade (> 10.000 cópias de DNA de *Leishmania* /mL) (Fig. 7).

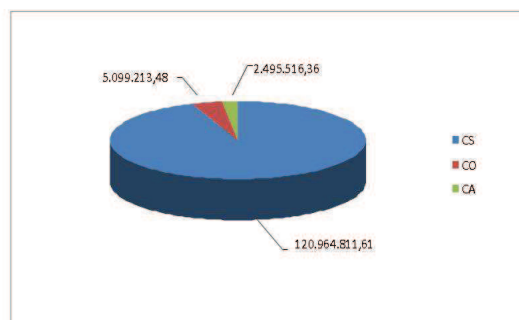


Figura 7- Quantidade média de cópias de *Leishmania*/mL de medula óssea, obtida a qPCR de cães com anticorpos anti-*Leishmania* (CL), distribuída entre os subgrupos CS (cães sintomáticos), CO (cães oligossintomáticos), CA (cães assintomáticos).

Quanto ao grupo CV, o teste detectou parasitos em 36,9% (17/46) dos animais, sendo 47,0% (8/17) representados pelo grupo CA e 52,9% (9/17) pelo subgrupo CO. (Fig. 8). A quantidade de parasitos detectados por mL de amostra analisada foi proporcionalmente inferior ao grupo CL, com média de 916,2 cópias de DNA de *Leishmania*/mL de medula óssea.

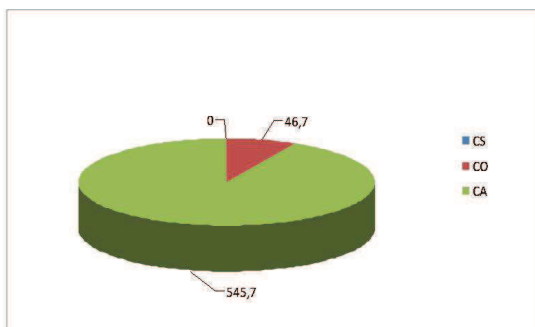


Figura 8- Quantidade média de cópias de *Leishmania*/mL de medula óssea, obtida a qPCR de cães vacinados com Leishmune® (CV), distribuída entre os subgrupos CS (cães sintomáticos), CO (cães oligossintomáticos), CA (cães assintomáticos).

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à intensidade parasitária medular, comparando-se o grupo CL e CV, em que foi possível observar que CL apresenta carga parasitária medular bastante superior à de CV. Considerando os subgrupos

CS/CL e CO/CL, não houve diferença significativa em relação à carga parasitária da medula óssea, já que a maioria dos animais (72%) foi categorizada com intensidade parasitária medular intensa (>10.000 cópias de DNA de *Leishmania*/mL). Quanto ao grupo CV, não houve diferença estatística entre a média de valores de qPCR de CA e CO. A qPCR de CS/CV não detectou parasitos na amostra de medula óssea avaliada.

Os valores médios (X) e desvio padrão (SD) da quantidade de cópias de DNA de *Leishmania*/mL de medula óssea, obtida a qPCR, estão dispostos por grupo e subgrupo na Tabela 5.

Tabela 5- Quantidade média de cópias de DNA de *Leishmania*/mL de medula óssea, obtida pela técnica de qPCR, e desvio padrão distribuídos entre grupos CL e CV e seus subgrupos CS, CO e CA

SUBGRUPO	GRUPO					
	CL			CV		
	n	X	SD	n	X	SD
CS	21	120.964.811,6 ^{Aa}	395.837.702,6	1*	0,0	0,0
CO	11	5.099.213,48 ^{Aa}	12.307.799,72	18	47,6 ^{Bb}	153,9
CA	1*	2.495.516,36*	0,0	27	545,7 ^{Bb}	2.803,6

CL: cães infectados; CV: cães vacinados; CS: cães sintomáticos; CO: cães oligossintomáticos; CA: cães assintomáticos; n: número de animais; X: média; SD: desvio-padrão.

Letras maiúsculas que se diferem referem-se à comparação dos subgrupos entre cada grupo, por meio do teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Letras minúsculas que se diferem se referem à comparação dos subgrupos dentro cada grupo por meio do teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

*Excluído da análise estatística pela baixa frequência ($n=1$).

5.2.5 Correlação entre sinais clínicos, alterações de patologia clínica e intensidade parasitária medular

Animais do grupo CL tenderam a apresentar maior frequência de esplenomegalia ($p < 0,05$) do que os oligossintomáticos e os assintomáticos.

Houve correlação positiva ($p < 0,05$) entre esplenomegalia observada em CL e a quantidade de parasitos detectada ao exame parasitológico direto da medula óssea.

Houve correlação fortemente significativa entre anemia, detectada ao hemograma, e a categoria clínica de sinais de CL, de forma que animais sintomáticos apresentaram

maior grau de anemia ($p < 0,05$). Também foi observada correlação entre a intensidade da carga parasitária medular, determinada ao exame parasitológico direto e ao grau de anemia ($p < 0,05$). Animais anêmicos sintomáticos apresentaram mais hiperglobulinemia ($p < 0,05$) e baixa relação A/G, sendo essa inversão altamente correlacionada à anemia em CI ($p < 0,05$).

Animais do grupo CL, com maior carga parasitária medular, detectada à qPCR, também apresentam mais frequentemente hiperproteinemia ($p < 0,05$), hiperglobulinemia ($p < 0,05$) e relação A/G diminuída ($p < 0,05$).

Não foram observadas alterações significativas à avaliação do hemograma e bioquímica sérica de CV, de modo que não houve correlações estabelecidas entre os dados obtidos para o grupo de animais vacinados e suas categorias clínicas. Não houve correlação entre o grau de anemia apresentado por CV e à intensidade parasitária.

6- DISCUSSÃO

O conjunto de sinais clínicos observado nos cães do grupo CL está de acordo com os achados descritos na literatura, diferindo apenas em relação à frequência com que as alterações são observadas. No presente estudo, a principal manifestação clínica detectada nos animais infectados foi dermatopatias, também observada por muitos pesquisadores (Aguiar et al., 2007; Sollano-Galego et al., 2009). Outros achados, como linfadenopatia, esplenomegalia, palidez de mucosas e emagrecimento também foram relatados por outros pesquisadores, embora a ordem de prevalência encontrada das alterações não tenha seguido a observada neste estudo (Costa-Val et al., 2007; De Freitas et al., 2012).

Nogueira et al. (2005), avaliando animais vacinados com Leishmune[®], provenientes de região endêmica para LV em São Paulo, relataram ausência de sintomatologia compatível com a doença em 100% dos cães. Já Da Silva et al. (2001), acompanhando animais vacinados com Leishmune[®], por um período de dois anos, detectaram sintomatologia discreta compatível com LV em 8% desses animais, ao passo que 33% dos animais não vacinados desenvolveram a doença. Borja-Cabrera et al. (2002), avaliando cães vacinados com Leishmune[®] e cães não vacinados, provenientes de região endêmica para LV no Rio Grande do Norte, também observaram sinais da doença em 5% dos cães vacinados, contra 25% de animais do grupo controle não vacinado.

A presença de sinais clínicos sugestivos de LV em 2,1% dos cães vacinados, encontrados nesse trabalho, corroboram com achados de Da Silva et al. (2001) e Borja-Cabrera et al. (2002). A ausência de sinais clínicos em 58,7% dos cães vacinados, corroboram com as observações realizadas por De Amorim et al. (2010), que relataram ausência de sintomatologia clínica de LV em 50% de animais vacinados com vacina Leishmune[®].

O estabelecimento de diferentes categorias clínicas entre os animais infectados, e até mesmo de animais vacinados, dependendo da presença ou ausência de sinais clínicos e sua quantidade, permite verificar o diverso espectro de manifestação da LV (Reis et al., 2006a), sendo muitos sinais inespecíficos e comumente observados em outras enfermidades (Gradoni, 2002). Por esse motivo, o diagnóstico clínico não é definitivo, sendo necessário associá-los ao diagnóstico laboratorial, empregando metodologias mais específicas (Alvar et al., 2004). Tal fato se comprova pelo resultado de qPCR de CA/CL, que revelou intenso parasitismo (< 10.000 cópias de DNA de *Leishmania* spp./mL de medula óssea) e o

resultado negativo da qPCR no animal considerado sintomático para LV do grupo CV.

A ocorrência de anemia normocítica e normocrômica em 90,4% dos animais infectados sintomáticos está de acordo com a maioria dos relatos da literatura (Paludo et al., 2007). Na LV, o principal mecanismo envolvido no aparecimento de anemia é a doença inflamatória crônica (Aguiar et al., 2007). A patogênese da anemia relaciona-se à produção exacerbada de anticorpos, estimulada pela ativação policlonal de linfócitos B, levando a um quadro de hiperglobulinemia e produção de auto-anticorpos e complexos imunes circulantes. Estes poderiam se ligar à membrana dos eritrócitos, ou se adsorverem a estas células, levando a sua menor sobrevivência. A presença de algumas linfocinas, como TGF- β , produzidas por L_T, está associada com a inibição da produção de eritrócitos, contribuindo também para o aparecimento da anemia (Bacellar e Carvalho, 2005). Alterações oxidativas ocorridas na membrana dos eritrócitos e da hemoglobina também podem contribuir para o aparecimento de anemia. Estudos realizados em Hamsters, experimentalmente infectados com *L. donovani* evidenciaram danos oxidativos na membrana dos eritrócitos e na hemoglobina, resultante de menor atividade das enzimas responsáveis pela destruição de radicais livres, formados após a infecção. Sendo assim, a degradação estrutural da membrana dos eritrócitos e de seu citoesqueleto, contribuiu para sua lise e, conseqüentemente, anemia (Sen et al., 2001).

Outra alteração laboratorial detectada com bastante frequência entre os animais do grupo CL foi a disproteinemia, caracterizada principalmente pelo aumento de globulinas e diminuição de albumina. A hiperglobulinemia na LV justifica-se pelo aumento da produção de imunoglobulinas, principalmente de IgG (Silva et al., 2010), através da ativação policlonal de linfócitos

B (Quinell et al., 2001), que pode ser estimulada por interleucinas, como a IL-1 e IL-6 (Stockham e Scott, 2008).

Rodríguez e colaboradores (2010) detectaram que cães naturalmente infectados, assintomáticos expressam maior proporção de citocinas relacionadas à ativação celular, como a IL-6, sendo mais efetivos em montar resposta protetora, evitando a progressão da doença. Esses dados justificam os achados em relação a CA/CL, que apresentou anemia normocítica, normocrômica e disproteinemia, com hiperproteinemia, hiperglobulinemia e inversão da relação A/G. A trombocitopenia observada nesse animal pode ser atribuída à baixa taxa de produção de plaquetas (Foglia-Manzillo et al., 2006; Reis et al., 2006a), devido à produção de citocinas (Bacellar e Carvalho, 2005) já que não foram observados megacariócitos à avaliação citológica da medula óssea.

O fato de se encontrarem tais alterações laboratoriais em CA aponta para a importância da realização de exames de rotina em animais provenientes de área endêmica para LV. Os resultados podem não revelar diagnóstico definitivo, mas são altamente presuntivos da ocorrência da doença.

Em média, alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas não foram achados significantes em CV, de modo que não se detectaram correlações entre os dados para o referido grupo. Tais observações estão de acordo com relatos da literatura, onde se observaram redução de sinais clínicos e parasitológicos em animais naturalmente infectados e vacinados. Segundo estudos desenvolvidos por Santos et al., (2007) a utilização de Leishmune[®] enriquecida por saponina, em animais experimentalmente infectados por *L. infantum*, permitiu a percepção de menos sinais clínicos e menor infecção tecidual nesse grupo em comparação ao grupo de

cães não vacinados, durante período aproximado de 15 meses. Tal fato indica o potencial da vacina em reduzir a sintomatologia clínica dos animais infectados vacinados, bem como a detecção de parasitos.

A medula óssea representa o principal órgão hematopoético e tecido linfóide primário, sendo por isso, considerado importante órgão de armazenamento de parasitos em cães infectados com *L. infantum*. Seu grau de parasitismo pode ser associado ao estado clínico apresentado pelo animal (Trópia de Abreu et al., 2011). Nesse trabalho foi possível detectar que CS/CL apresentaram maior positividade ao exame parasitológico e maior carga parasitária quando comparados aos CO/CL. Como sugerido por Reis et al. (2006a), os animais sintomáticos tendem a apresentar maior parasitismo do que os não sintomáticos, como foi observado no presente estudo, em que houve diferença estatisticamente significativa entre a categoria clínica e o grau de parasitismo medular. No animal assintomático não foram detectados parasitos, o que confirma os relatos de alguns pesquisadores que apontam ser comum o resultado parasitológico negativo em animais com ausência de sintomatologia clínica ou doença crônica (Ikeda-Garcia et al., 2006).

De acordo com Reis et al. (2006b), animais com maior parasitismo medular apresentam maior grau de anemia, como foi constatado pelos resultados obtidos à avaliação dos animais infectados nesse estudo. Animais com parasitismo moderado apresentaram anemia mais acentuada que aqueles com baixo parasitismo.

O exame parasitológico de medula óssea revelou positividade de 90,5% em CS/CL, apresentando sensibilidade superior à relatada na literatura que seria de, no máximo, 80% (Brasil, 2006) e de 54,5% nos animais oligossintomáticos, sendo esse

valor mais próximo ao relatado por Gradoni (2002), que foi de 60%. Como sugerido por Reis et al. (2006a), animais sintomáticos tendem a apresentar parasitismo moderado a intenso, e animais assintomáticos tendem a apresentar baixo parasitismo, ou nulo, como detectado no estudo.

Dentre os CL, foi possível identificar em mais de 70%, aumento da relação M:E, sendo presente principalmente em animais sintomáticos, o que corrobora com relatos de Foglia Manzillo et al. (2006). O aumento da linhagem granulocítica e/ou diminuição da linhagem eritróide são os fatores correlacionados ao aumento de relação M:E, comumente observada em animais com LV.

Os resultados obtidos mostraram que a prevalência de LV em CL, determinada pela realização de qPCR (93,3%), mostrou ser superior ao exame parasitológico direto (75,7%), pois além de confirmar os resultados obtidos pelo método parasitológico, identificou presença de *Leishmania* sp. em 6 animais, cujos resultados foram negativos à análise microscópica da medula óssea. De Queiroz et al. (2010) detectaram 100% de positividade à realização de PCR em animais assintomáticos, classificados como não infectados por outras metodologias, mostrando elevada sensibilidade do método. Martínez et al. (2011) sugeriram para avaliação de animais assintomáticos, mas com suspeita de LV, coleta de medula óssea ou linfonodo para realização de qPCR, por aumentar a sensibilidade de detecção do parasito pela metodologia, fato corroborado neste estudo, pois a sensibilidade de detecção de animais positivos pela técnica, utilizando-se medula óssea, foi alta, além de confirmar positividade em CA/CL.

Outra questão observada nesse trabalho, conforme descrito por Quaresma et al. (2009), é que a qPCR permite identificar

animais positivos para LV, independentemente da condição clínica ou sintomatologia apresentada pelo cão. O resultado obtido à qPCR parece não estar diretamente relacionado à intensidade de sinais clínicos apresentada pelo cão, diferentemente ao que se observa no exame parasitológico direto, por exemplo. Dessa forma foi possível identificar positividade no único animal assintomático de CL e confirmar infecção em cinco animais oligossintomáticos e em um animal sintomático, também de CL, cujos resultados do exame parasitológico direto foram negativos.

Os métodos de diagnóstico empregados, como o teste parasitológico direto e qPCR, não confirmaram infecção no único animal vacinado, com sinais sugestivos da doença, sendo considerado, portanto, negativo para LV. A qPCR revelou infecção por *Leishmania* spp. em aproximadamente 37% (17/46) de CV, sendo 47% de CA e 52,9% de CO, reforçando mais uma vez a importância da utilização de qPCR na detecção da infecção pelo parasito, inclusive em CV. Embora a vacina promova proteção duradoura de 92% (Da Silva et al., 2001) a 95% (Borja-Cabrera et al., 2002) nos animais, não há como eliminar completamente o risco da infecção, principalmente em áreas endêmicas. Além dessa questão, não há como prever em que momento os cães contraíram o parasito, sendo que a infecção poderia ser anterior à vacinação.

A carga parasitária média observada em CV foi inferior à detectada em CL. Enquanto CV apresentaram discreta positividade, em torno de 916,12 cópias de DNA parasitário/mL de medula óssea, os CL apresentaram, em média, 78.752.966,92 de cópias de DNA parasitário/mL de medula óssea.

O resultado obtido à qPCR para CA/CV foi maior que o obtido para CO/CV,

mostrando que a vacina Leishmune® limita o aparecimento dos sinais clássicos da doença em animais infectados pelo parasito. Achado semelhante, mas com objetivo final diferente do presente estudo, foi observado por Santos et al. (2007), que avaliaram o efeito imunoterapêutico da vacina Leishmune®, enriquecida com 1mg de saponina, administrada em cães experimentalmente infectados, após seis meses da infecção. Foi constatada redução da severidade e da quantidade de sinais clínicos apresentados por esses animais, mostrando que a vacina Leishmune® apresenta papel importante na redução da sintomatologia clínica e, no presente estudo, inibe ou retarda o aparecimento da doença..

A literatura não relata dados em relação à utilização de qPCR em animais vacinados com Leishmune®. Aponta apenas a utilização cPCR com amostras de linfonodos e sangue total coletados de animais vacinados, mostrando negatividade em 100% dos animais avaliados (Nogueira et al., 2005, De Amorim et al., 2010). Contudo, alguns estudos revelam que a qPCR se mostra mais sensível em detectar o parasito, comparando-se a cPCR (Francino et al., 2006; Ramos et al., 2012). Ainda deve-se considerar que o uso de variados tipos de tecido pode fornecer diferentes resultados, pois a carga parasitária entre os tecidos é variável, podendo ser detectada em alguns, enquanto em outros não, alterando a sensibilidade do método (Francino et al., 2006).

7- CONCLUSÕES

A grande variedade de sinais clínicos não específicos torna as técnicas laboratoriais indispensáveis ao diagnóstico da LV.

Os resultados parasitológico direto e de qPCR revelaram presença de *Leishmania* na medula óssea de cães sorologicamente positivos e nos vacinados com Leishmune®.

Cães vacinados com Leishmune[®], porém infectados com *Leishmania infantum*, não apresentam sintomatologia clássica da doença, bem como não possuem alterações detectadas à avaliação do hemograma e bioquímica sérica.

A vacina Leishmune[®] reduziu a progressão e manifestação da LV nos animais vacinados e infectados pelo parasito e controlou a proliferação de *L. infantum* na medula óssea.

CAPÍTULO 2
ASPECTOS DE XENODIAGNÓSTICO, TESTES SOROLÓGICOS DE ELISA-SLA, ELISA-FML E DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA DE MEDULA ÓSSEA DE CÃES COM ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* E DE VACINADOS COM LEISHMUNE®

1- LITERATURA CONSULTADA

1.1 Agente etiológico, transmissão e reservatórios da leishmaniose visceral canina

O gênero *Leishmania* abriga grande número de espécies, das quais cerca de 22 são causadoras de afecções cutâneas ou

viscerais em seres humanos, sendo esta última causadora de lesões graves, se tornando fatal quando não se institui terapia adequada (Ashford, 2000). As principais e mais pesquisadas espécies de interesse para a medicina estão dispostas na figura 1.

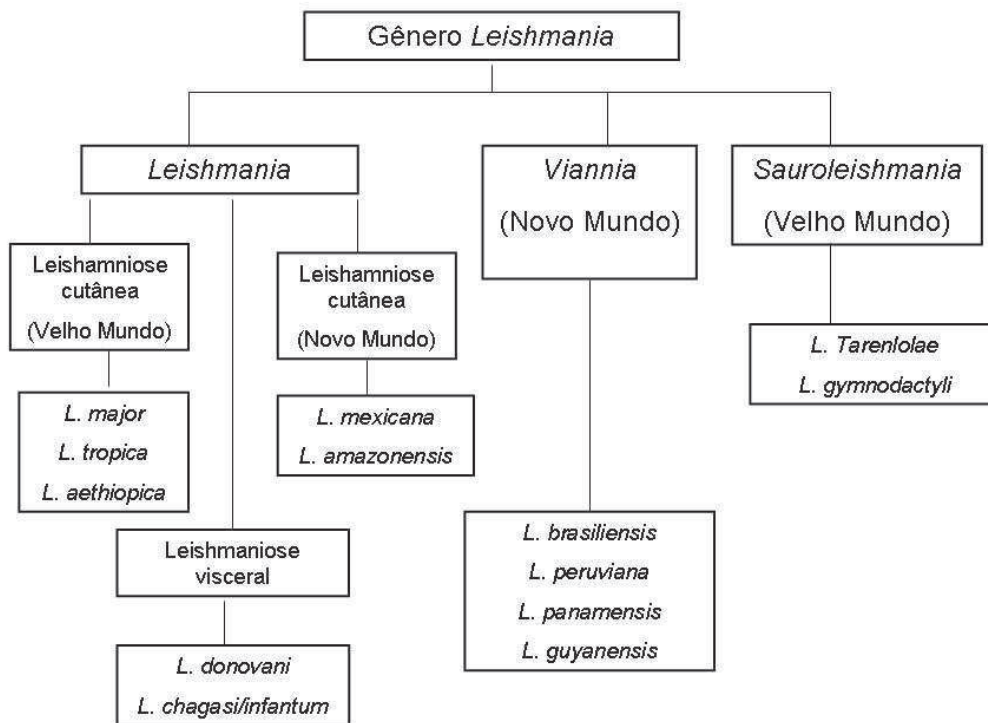


Figura 1- Esquema das principais e mais pesquisadas espécies de *Leishmania*, com maior interesse e importância na Medicina. Parasitos do gênero *Leishmania* e *Viannia* infectam mamíferos, enquanto que os do *Sauroleishmania* infectam répteis. Fonte: Bates, 2007.

A leishmaniose visceral canina (LVC) tem como agente etiológico protozoários da espécie *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* [sinônimo de *L. (Leishmania) infantum*] (Maurício et al., 2001; Silva, 2007)

pertencentes à classe Kinetoplastida, família Trypanossomatidae (Dantas-Torres, 2006). *Leishmania donovani* é apontada como causadora de LV em humanos na África, Europa e Ásia, enquanto *L.*

infantum causa infecção tanto em humanos quanto em animais nas Américas, Ásia, África e Europa (Michalick e Genaro, 2005).

A principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas infectadas de dípteros da família Phlebotomidae, subfamília Phlebotominae. A *Lutzomyia (lutzomyia) longipalpis*, espécie de hábitos alimentares oportunistas, é a principal espécie transmissora na América (Dias et al., 2003; Gállego, 2004). Outras formas de transmissão do parasito também foram relatadas, como a vertical transplacentária (Masucci et al., 2003; Dubey et al., 2005) e por transfusão sanguínea (Gállego, 2004; De Freitas et al., 2006). À semelhança que ocorre no homem (Gállego, 2004), transmissão venérea foi apontada como possível forma de transmissão da LV, ao serem identificadas formas do parasito no sêmen de animais sexualmente maduros, naturalmente infectados (Diniz et al., 2005). Estudos indicaram a presença de DNA de *L. infantum* em fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* que se alimentaram em animais infectados (Sollano-Galego et al., 2012), bem como em ovos e ninfas, indicando a ocorrência de transmissão vertical em carrapatos (Dantas-Torres et al., 2011). Porém, ainda é necessário investigar o real papel do carrapato na epidemiologia da infecção de *L. infantum* aos cães em áreas endêmicas (Sollano-Galego et al., 2012).

Os principais reservatórios do parasito incluem animais da família Canidae, sendo o cão doméstico (*Canis familiaris*) considerado o principal mantenedor da doença em áreas urbanas. *L. infantum* também foi identificada em outros animais, como marsupiais (*Didelphis albiventris* e *D. marsupialis*), roedores (*Rattus rattus*, *Nectomys squamipes*, *Proechimys*

canicollis) e gatos domésticos (*Felis catus*) (Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006; Silva et al., 2010).

1.2 Vetores da LVC

No velho mundo, *L. infantum* é transmitida pela picada das fêmeas do gênero *Phlebotomus*, enquanto no novo mundo, a doença é transmitida principalmente por *L. longipalpis*. *L. cruzi* já foi identificada como transmissora de LV no Mato Grosso do Sul (Elkhoury, 2005; Missawa, 2011).

Os flebotomíneos são insetos holometabólicos, que passam pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto durante a metamorfose. As formas imaturas têm o habitat terrestre, desenvolvendo-se em locais ricos em matéria orgânica em decomposição, especialmente de natureza vegetal. Os adultos, tanto machos quanto fêmeas, necessitam de carboidratos para exercerem suas atividades de voo, acasalamento e postura, obtendo sua fonte de energia de seiva vegetal e secreções açucaradas de outros insetos, como pulgões. Os carboidratos ingeridos pelas fêmeas são importantes, não somente para sua manutenção, mas também para o desenvolvimento e infectividade de *Leishmania* em seu intestino. Açúcares como frutose e sacarose agem como bacteriostáticos e atuam como fonte de energia para *Leishmania*, que se multiplica mais facilmente (Brazil e Brazil, 2003).

A hematofagia realizada pelas fêmeas é necessária para que ocorra desenvolvimento ovariano adequado, sendo o número de ovos produzidos proporcional à quantidade de sangue ingerido. Geralmente, a ovoposição ocorre após um repasto sanguíneo. Entretanto, pode ocorrer um segundo repasto antes da ovoposição. Tal fato assume extrema importância epidemiológica, pois aumentam as chances de transmissão de parasitos, como *L.*

infantum aos animais vertebrados (Pimenta et al., 2003).

A floresta tropical oferece a maior variedade de abrigos e, por isso, é o local onde ocorre o maior número de espécies de flebotomíneos. *L. longipalpis* tem preferência em habitar troncos de árvores e raízes tubulares, fendas de rochas, grutas, e em áreas marginais, anexos de animais domésticos (galinheiros, chiqueiros, currais), parede externa e interna do domicílio humano. Habita, portanto, tanto ambientes silvestres, como semidomésticos (Aguiar e Medeiros, 2003). A umidade relativa do ar (Brazil e Brazil, 2003) e altas temperaturas (Amóra et al., 2010) constituem fatores determinantes para a manutenção desses insetos em seus abrigos. A espécie está presente nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (Aguiar e Medeiros, 2003).

As peças bucais dos flebotomíneos são relativamente curtas (0,2 a 0,4 mm), não permitindo que aprofundem muito na pele para se alimentar. Dessa forma utilizam suas probóscidas para dilacerar o tecido e os vasos, fazendo com que seja formada uma poça de sangue no local e, então, possam fazer o repasto. A saliva dos insetos hematófagos realiza um papel importante no momento do repasto sanguíneo, não permitindo a coagulação do sangue, além de induzir à vasodilatação (Brazil e Brazil, 2003). Tais eventos são possíveis pela presença de um peptídeo, denominado maxadilan, que aumenta a perfusão sanguínea em regiões mais superficiais da pele. A maxadilan está envolvida na patogênese da LV, pois sua presença leva a lesões mais graves e duradouras de pele (Yin et al., 2000). A essa proteína, também é atribuída a função imunomoduladora, estimulando a resposta celular por linfócitos T *helper* do tipo Th2, relacionada à suscetibilidade do hospedeiro à manifestação da doença, ao mesmo tempo em que inibe a resposta por linfócitos Th1,

que promove resistência à doença. Dessa forma, o estímulo à resposta Th2 favorece o desenvolvimento da resposta imune humoral, com a formação de auto-anticorpos e a criação de imunocomplexos que se depositam em vasos de vários tecidos, contribuindo para o agravamento da doença (Day, 2011).

1.3 Ciclo biológico do parasito no vetor

O desenvolvimento de *Leishmania* no intestino do vetor compreende várias formas assumidas pelo parasito, que vai desde as amastigotas, sem flagelo aparente, adquiridas durante o repasto em hospedeiro infectado, passando por promastigotas procíclicas e, por fim, em promastigotas metacíclicas (Fig.2) (Freitas et al., 2012).

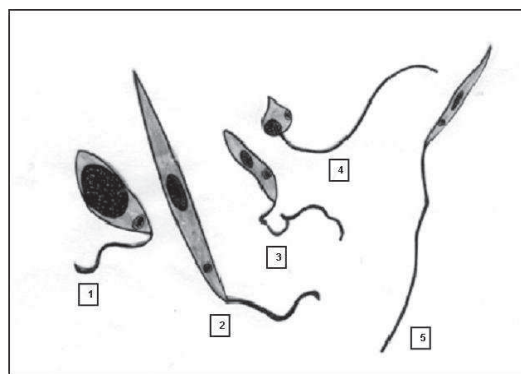


Figura. 2- Desenvolvimento de formas de *Leishmania* no intestino do flebotomíneo. 1- Promastigota procíclica. 2- Promastigota nectomona. 3- Promastigota haptomona. 4- Promastigota paramastigota. 5- Promastigota metacíclica. Fonte: Freitas, 2012.

A *L. infantum* apresenta comportamento suprapilárico, ou seja, seu desenvolvimento no trato digestivo é anterior ao piloro, principalmente nas regiões abdominais e torácicas do intestino médio dos vetores (Fig. 3) (Lainson e Shaw, citado por Freitas, 2010).

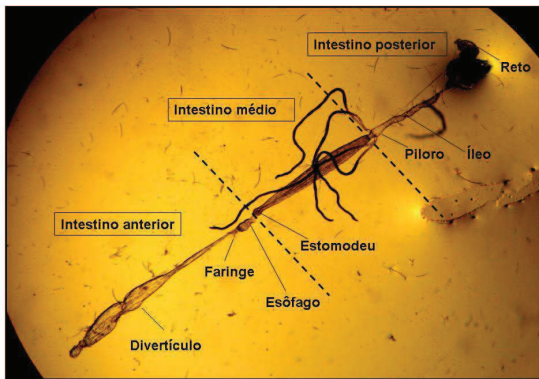


Figura 3- Desenho esquemático do tubo digestivo dissecado de *L. longipalpis*, mostrando a divisão do tubo digestivo em intestino anterior, médio e posterior, separados pela linha tracejada. Fonte: arquivo pessoal.

Ao fazerem repasto sanguíneo nos mamíferos, os flebotomíneos ingerem as formas amastigotas, que em seu tubo digestivo, sofrem algumas transformações. À medida que vão progredindo do intestino posterior até a probóscida, vão se diferenciando até a forma infectante (promastigota metacíclica), através da metaciclogênese.

Entre seis a 12 horas após a hematofagia, as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, que são curtas, ovóides, discretamente móveis, sendo as primeiras formas promastigotas a aparecerem no flebotomíneo (Freitas et al., 2012). Elas ficam envolvidas numa espécie de malha de proteínas e quitina, denominada matriz peritrófica, secretada pelo epitélio intestinal do flebotomíneo, juntamente com o sangue ingerido, protegendo-as da ação de enzimas hidrolíticas (Bates, 2007).

Após 36 a 48 horas, essas formas se multiplicam e diferenciam em promastigotas nectomonas, apresentando corpo celular alongado, se libertando da matriz peritrófica. Em cerca de dois a cinco dias, as nectomonas preenchem o intestino abdominal anterior e se transformam em formas curtas e largas denominadas

haptomonas, que são envoltas e imobilizadas por um gel produzido pelos parasitos, chamado *Promastigote Secretory Gel* (PSG). Após cerca de cinco dias da ingestão sanguínea, as haptomonas se diferenciam em promastigotas metacíclicas infectantes, que são muito móveis e livres para alcançar a faringe e probóscida, sendo liberadas com a saliva do flebotomíneo. Estas são finas e curtas e com flagelo longo.

Ao ocorrer novo repasto sanguíneo, as formas infectantes são regurgitadas juntamente com a saliva do vetor em um novo hospedeiro, completando o ciclo heteróximo da doença (Pimenta et al., 2003; Freitas et al., 2012). Existe uma forma intermediária entre as haptomonas e as promastigotas metacíclicas, que é a promastigota paramastigota, raramente visualizada, representando cerca de 0,1 a menos de 2% do total de formas parasitárias. Elas apresentam formato de pêra, ou ovalar, com flagelo de tamanho variável (Freitas et al., 2012; Rogers et al., 2002).

As formas procíclicas são consideradas as formas multiplicativas necessárias para o estabelecimento da infecção. As metacíclicas são as formas infectivas adaptadas a infectarem os vertebrados (Pimenta et al., 2003). Apenas as formas metacíclicas, transmitidas pela picada de flebotomíneos, são aptas a induzirem infecção no hospedeiro vertebrado (Freitas et al., 2012).

Nas fases iniciais da infecção do intestino do vetor, várias formas parasitárias morrem pela ação de enzimas intestinais, semelhantes à tripsina, fazendo reduzir significativamente a população de parasitos de *L. infantum* (Freitas et al., 2012), pois algumas escapam da proteção da matriz peritrófica (Pimenta et al., 2000; Bates, 2007).

O PSG secretado pelas formas de *Leishmania* desempenha papel importante na transmissão de formas infectantes ao hospedeiro vertebrado. A associação do gel e dos parasitos, principalmente as haptomonas e, em menor concentração, as metacíclicas formam um *plug*, que força a válvula estomodeu a abrir, empurrando os parasitos para a região da faringe, facilitando o alcance da probóscida e sua eliminação durante o repasto sanguíneo (Bates, 2007).

1.4 Vacina Leishmune®

A Leishmune® é categorizada como vacina de segunda geração, sendo composta pela fração fucose manose-ligante (FML), um complexo glicoproteico purificado de promastigotas do complexo *L. donovani* (Borja-Cabrera et al., 2002), adicionada de adjuvante, as saponinas. A FML constitui potente inibidor da internalização de amastigotas em macrófagos do hospedeiro vertebrado, impedindo sua fagocitose (Palatinik-de-Souza et al., 1989). As saponinas apresentam efeito co-estimulatório, potencializando a resposta mediada por células, principalmente do tipo Th1 (Menz, 2006).

A eficácia da vacina foi comprovada em estudos anteriores, através da vacinação de cães provenientes de áreas endêmicas do Brasil, sendo constatada taxa de proteção de 92% a 95% (Da Silva et al., 2001; Borja-Cabrera et al., 2002).

Outros trabalhos apontaram para o potencial da vacina em bloquear a transmissão do agente. Trinta e dois cães domiciliados em Andradina, pertencentes à amostra de 600 cães vacinados no programa piloto, receberam três doses de Leishmune®. Quarenta cães da mesma área permaneceram como controles não tratados durante todo o período do estudo. O potencial de infecciosidade foi avaliado pela verificação da presença de DNA de

Leishmania em testes de PCR de amostras de sangue e linfonodos e por testes de imunoistoquímica (IMIQ) de pele. Constatou-se positividade de 15,7% e 56,7% a PCR de sangue e linfonodo, respectivamente, e de 25% a IMIQ para os animais controle. Em contrapartida, os cães vacinados apresentaram 100% de negatividade aos mesmos testes, apontando sua condição não infectiva (Nogueira et al., 2005)

Estudos realizados em laboratório através da alimentação de vetores com soros imunes, provenientes de cães vacinados com Leishmune®, incubados com formas promastigotas procíclicas de *L. donovani* e *L. infantum*, demonstraram que a intensidade parasitária dos intestinos dos flebotomíneos diminui com o aumento da concentração de anticorpos vacinais presentes. Além disso, os anticorpos foram capazes de inibir a ligação de promastigotas aos intestinos dos flebotomíneos, mostrando seu efeito bloqueador da transmissão (Saraiva et al., 2006).

O potencial imunoterapêutico da Leishmune® foi avaliado por Santos et al. (2007). A vacina foi enriquecida com 1mg de saponina e administrada em cães experimentalmente infectados, após seis meses da inoculação de *L. infantum*. período em que se observaram os primeiros sinais da doença. Constatou-se redução da gravidade e da quantidade de sinais clínicos apresentados pelos cães, bem como controle da parasitemia detectada pela PCR. Comparativamente, o grupo controle ao qual foi administrado salina, apresentou doença progressiva, ao longo do período de estudo, e alta positividade detectada à PCR.

Outros estudos apontaram para efeito adicional do uso da vacina Leishmune® na redução de casos de leishmaniose visceral em humanos e cães, em regiões endêmicas para a doença no Brasil. Em Araçatuba, SP, constatou-se redução da incidência de casos

em cães e humanos de 25 e 61%, respectivamente, durante período de avaliação de dois anos, realizando-se vacinação regularmente nos cães. Em Belo Horizonte, MG, constatou-se que, nos bairros onde foi realizada maior cobertura vacinal nos cães com Leishmune[®], a incidência da LVC foi menor, contrariamente àqueles bairros em que a cobertura vacinal não ocorreu, sendo relatado maior número de casos da doença. Tais fatos permitiram constatar que a vacina Leishmune[®] constitui ferramenta importante na diminuição da propagação da LV em cães e humanos (Palatinick-de-Souza et al., 2009).

1.5 Resposta imune contra *Leishmania* spp.

O tipo de resposta imune predominantemente desenvolvida pelo animal infectado por *L. infantum* vai determinar o aparecimento ou não de sinais clínicos. Cães infectados podem desenvolver sinais clínicos compatíveis com a doença, chegando à morte, enquanto outros desenvolvem um ou poucos sinais, sendo classificados como oligossintomáticos, ou permanecendo sem alterações clínicas, sendo classificados como assintomáticos (Barbiéri, 2006).

A resposta contra as formas de *Leishmania* é regulada, em grande parte, por linfócitos T CD4⁺ ou auxiliares (Th), que produzem uma grande variedade de citocinas em resposta a estes antígenos (Sanchez-Robert et al., 2008; Rodríguez et al., 2010; Mougneau et al., 2011).

A resistência à doença observada em cães com LV está associada à resposta imune celular mediada por linfócitos T, do tipo Th-1, que produzem principalmente interferon gama (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). A presença de IFN- γ e TNF- α ativam macrófagos a fagocitar e eliminar as

amastigotas pela via do óxido nítrico, promovendo o controle do parasitismo (Barbieri, 2006).

A suscetibilidade ocorre quando a resposta imune é estimulada pela produção de IL-4, IL-10 e IL-13, fazendo com que a resposta humoral se sobreponha à celular, ocorrendo exacerbação da produção de anticorpos, principalmente IgG e IgM e de imunocomplexos, levando a danos em vários órgãos. A IL-10 é apontada como a principal responsável por estimular a resposta do tipo Th-2, inibindo a produção de IFN- γ , sendo esta a principal citocina responsável pela proteção (Miralles et al., 1994). O IFN- γ ainda estimula a formação de granulomas, que são importantes na defesa do organismo contra parasitos intracelulares, como *Leishmania* (Schijns e Horzinek, 1999). Embora Lima et al. (2006) correlacionaram a presença de elevados níveis de IL-6 em cães naturalmente infectados por *L. infantum* a possível infecção ativa e a doença grave, Rodrigues e colaboradores demonstraram o oposto. Segundo estes autores, cães assintomáticos apresentaram maior concentração de IL-6, sendo mais efetivos em montar resposta protetora, evitando assim a progressão da doença.

Rodríguez e colaboradores (2010) detectaram que cães naturalmente infectados assintomáticos expressam maior proporção de citocinas relacionadas à ativação celular (IL-2) e à indução de resposta inflamatória (IFN- γ , TNF- α), quando comparados a cães naturalmente infectados sintomáticos. Cães assintomáticos apresentaram maior concentração de IL-6, sendo mais efetivos em montar resposta protetora, evitando a progressão da doença.

A presença de células T CD8⁺, ou linfócitos T citotóxicos, também auxilia no controle à infecção por *Leishmania*, atuando na proteção do organismo contra

reinfeção e auxiliando na resolução da doença. Essas células atuam estimulando a secreção de IFN- γ , que é necessário à ativação de macrófagos, que vão destruir os parasitos, além de atuar na supressão de células Th-2 (Kaye e Aebischer, 2011).

A LVC associa-se à elevada produção de imunoglobulinas, através da ativação policlonal de linfócitos B. A resposta humoral específica da LVC caracteriza-se pela produção de elevados níveis de IgG anti-*Leishmania*, permitindo ampla utilização do diagnóstico sorológico (Quinnell et al., 2001). Tanto IgG total quanto suas subclasses têm sido extensivamente estudadas por diversos autores, utilizando-se diferentes antígenos de *L. infantum*, mas sem o estabelecimento de padrão específico de imunoglobulinas entre os animais estudados. Alguns autores identificaram que animais naturalmente infectados apresentaram ambas as subclasses IgG1 e IgG2, sendo IgG2 associada com cães infectados assintomáticos e IgG1, a cães infectados sintomáticos, com doença ativa (Desplazes et al., 1995; Nieto et al., 1999). Outros autores demonstraram que IgG1 não está correlacionada a doença ativa, mas sim, IgG2 (Almeida et al., 2005; Cardoso et al., 2007). Marcondes et al. (2011) demonstraram que cães naturalmente infectados, tanto os sintomáticos quanto os assintomáticos desenvolveram elevados níveis de IgG total, sendo o aumento correlacionado principalmente ao aumento da subclasse IgG2. Neto et al. (2010), verificaram a presença de elevados níveis de IgG total em animais infectados sintomáticos, associando-os ao alto parasitismo de pele e com elevada concentração de IgG2, comparando-se aos animais assintomáticos, que apresentaram concentrações menores de IgG total, baixo parasitismo tecidual epitelial, com predomínio de imunoglobulinas do tipo IgG1. Outros autores também afirmaram haver correlação positiva entre achados

clínicos e parasitológicos com elevadas concentrações de imunoglobulinas (Reis et al., 2006b).

1.6 Resposta imune em cães vacinados com Leishmune[®]

Cães vacinados com Leishmune[®] tendem a apresentar aumento significativo de níveis de INF- γ e diminuição da concentração de IL-4 e TNF- α (De Lima et al., 2010), mas não foi possível estabelecer, também, padrão em relação aos níveis das subclasses de IgG pertencentes a animais vacinados com Leishmune[®], mesmo comparados aos de animais infectados (Mendes et al., 2003; De Amorim et al., 2010; Marcondes et al., 2011).

O pico de anticorpos induzido pela Leishmune[®] podem ser detectados a partir de 45 dias após a aplicação da terceira dose de vacinação, permanecendo alto por até seis meses após o início do protocolo de vacinação (Marcondes et al., 2011).

Estudos desenvolvidos por De Amorim et al. (2010) mostraram que cães vacinados com Leishmune[®] apresentam perfil imunológico diferente quando comparado a cães naturalmente infectados, ao se utilizar antígenos SLA (antígeno solúvel de *Leishmania*) e fucose-manose ligante (FML), detectado por método imunoenzimático (ELISA). Cães vacinados apresentaram níveis maiores de anticorpos anti-FML, baseados nos valores de IgG total e IgG2 e níveis de IgG1 maiores utilizando-se antígenos SLA. Embora tenha ocorrido essa diferença, ainda assim, não foi possível distinguir entre os animais verdadeiramente positivos para LV e os vacinados. Marcondes et al. (2011) relataram que antígenos policlonais comerciais utilizados na detecção de anticorpos contra *Leishmania*, por método de ELISA, não foram capazes de diferenciar os níveis de IgG total, IgG1 e IgG2, de animais naturalmente infectados

dos de animais vacinados com Leishmune[®]. A avaliação de quatro subclasses de IgG pelos mesmos autores, determinada por anticorpos monoclonais também não foi capaz de diferenciar animais infectados sintomáticos dos vacinados. Apenas os níveis de IgG3 e IgG4 foram diferentes entre cães infectados assintomáticos e os vacinados, sendo esses parâmetros utilizados para diferenciar animais entre os dois referidos grupos.

1.7 Métodos diagnósticos laboratoriais da LVC

1.7.1 Métodos parasitológicos

Embora não seja rotineiramente empregado em técnicas laboratoriais, o xenodiagnóstico é uma técnica utilizada na identificação e isolamento do parasito em seu vetor artrópode natural (Guarga et al., 2000). Trata-se de uma técnica bastante importante no que se refere à resolução de questões epidemiológicas sobre o quadro clínico e a resposta ao tratamento de cães com LV (Alvar et al., 2004). Pode ser empregado de forma direta, através da alimentação de flebotomíneos diretamente do animal sedado (Gradoni, 2002), ou de forma indireta, em que os flebotomíneos se alimentam do sangue coletado do animal, não sendo necessária a sEDAÇÃO (Guarga et al., 2000).

A infectividade de fêmeas de *L. longipalpis*, alimentadas em cães naturalmente ou experimentalmente infectados, tem sido bastante investigada por alguns autores, sendo a taxa de infecção dos flebotomíneos correlacionada à sintomatologia presente no animal (Travi et al., 2001; Michalsky et al., 2007; Costa-Val et al., 2007; Soares et al., 2011).

O exame parasitológico direto é tido por alguns autores como “padrão ouro” no diagnóstico definitivo da LV (Gradoni, 2002; Barrouin-Melo et al., 2006; Machado

et al., 2006). Formas amastigotas do parasito podem ser observadas em esfregaços de material obtido de medula óssea, linfonodo, aspirado esplênico, corados por métodos de rotina, como os corantes do tipo Romanowsky. Apesar da elevada especificidade, o método apresenta pequena sensibilidade (Ciaramella et al., 1997), principalmente se tratando de animais assintomáticos que, de maneira geral, apresentam menor intensidade parasitária tecidual (Moreira et al., 2007; Trópia de Abreu et al., 2011). Em alguns casos, a visualização do parasito se torna muito laboriosa, não sendo incomum a detecção de amostras negativas, principalmente se tratando de casos de doença crônica (Ikeda-Garcia et al., 2006). A detecção de promastigotas em culturas de tecidos anteriormente citados pode apresentar-se mais sensível que o método parasitológico direto (Alvar et al., 2004), mas pode sofrer interferência do tipo de meio de cultura utilizado, sendo que os meios semi-sólidos apresentam-se mais eficientes que os líquidos; da relação entre a quantidade de material semeado e o número de meios de cultura viáveis utilizados; e da quantidade de diferentes tecidos coletados de um mesmo animal, aumentando-se as chances de detecção de amostras positivas (Gradoni, 2002).

Técnicas de histopatologia também são empregadas no diagnóstico parasitológico da LV e somente a visualização dos parasitos permite o diagnóstico definitivo (Tafari et al., 2001). Provas de imunohistoquímica (IHQ) apresentam maior sensibilidade em relação aos exames histopatológicos, apresentando a vantagem de oferecer maior contaste entre o parasito e o tecido do hospedeiro, possibilitando mais facilmente a identificação das amastigotas de *Leishmania* (Tafari et al., 2004; Tasca et al., 2009). Assis et al. (2010) avaliaram comparativamente métodos de diagnóstico sorológico (ELISA-SLA e RIFI) e parasitológico (histoquímica - HE-, IHQ)

para LV e detectaram que, dentre eles, o ELISA-SLA foi o que detectou maior índice de positividade (65%), seguido pela IMIQ (62%), RIFI (56%) e HE (56%).

1.7.2 Métodos sorológicos

Os níveis de imunoglobulinas produzidos por animais infectados podem ser detectados por diferentes técnicas sorológicas, empregando-se tipos variados de antígenos de *Leishmania* (Gradoni, 2002), com grande variação de resultados entre os trabalhos publicados. Relatam-se o uso de diferentes técnicas, como Reação de Fixação do Complemento (Flemmings et al., 1984; Pappas et al., 1985), Hemaglutinação Indireta (Mohammed et al., 1886), hemaglutinação direta (Harith et al., 1987), Reação de Imonoflorescência Indireta (RIFI) (Badaró et al., 1983; Costa et al., 1991), ensaio imunoenzimático (ELISA - Enzyme Linked Imunosorbent Assay) (Mohamed et al., 1986; Costa et al., 1991, Badaró, 1986).

Os testes sorológicos diagnósticos preconizados pelo Ministério da Saúde são o ELISA, que é empregado como triagem e a RIFI, como confirmatório. O primeiro caracteriza-se por ser mais sensível e o segundo por ser mais específico (Brasil, 2006). O diagnóstico sorológico da LV, de maneira geral, representa grande dificuldade para os serviços de saúde pública, pois não existem técnicas 100% sensíveis e específicas, além de serem necessários elevados níveis de anticorpos para obter-se resultado positivo (Machado, 2006). Além disso, existe a possibilidade de ocorrer reações cruzadas com outras doenças, principalmente a doença de Chagas e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) para ambas as técnicas (Brasil, 2006). Os testes de ELISA refletem melhor o cenário da doença em áreas endêmicas (Borja-Cabrera et al., 1999).

A RIFI é considerada teste ouro na avaliação por pesquisadores no Velho Mundo, mas diferentemente do Brasil, nos países europeus não há a preocupação com reações cruzadas com doenças citadas anteriormente (Gradoni, 2002).

O teste sorológico mais utilizado é o ELISA, que apresenta elevada sensibilidade e especificidade dependendo do antígeno utilizado. Os mais empregados derivam de antígenos totais de promastigotas de *Leishmania*, sendo a maioria particulados. Esse fato desfavorece o desempenho do método, já que em sua composição estão presentes inúmeros constituintes antigênicos, que apresentam epítomos comuns a outros antígenos, reduzindo a sensibilidade e, especialmente, a especificidade. Diante disso, tem-se dado maior ênfase para a utilização de antígenos recombinantes e purificados, com o objetivo de se obterem resultados mais específicos (Reis e Coura-Vital, 2007; De Souza et al., 2012).

De Souza et al. (2012) avaliaram o isolamento e purificação de dois antígenos recombinantes *L. infantum*, rLci2B e rLci1A, e sua aplicação no ELISA. Foram utilizados soros provenientes de cães das regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, sendo 119 negativos para a doença, 138 positivos e 86 soros negativos para LV, mas positivos para outros agentes que apresentam reatividade cruzada com LV, tais como *Trypanosoma caninum* (14), *L. brasiliensis* (34), *Babesia canis* (20) e *Ehrlichia canis* (18). Os resultados mostraram 100% de sensibilidade e 95% de especificidade para o antígeno rLci2B e 96% de sensibilidade e 95% de especificidade para rLci1A. As proteínas purificadas não apresentaram reação cruzada com soro de cães infectados com *T. caninum*, *B. canis* e *E. canis*. Entretanto, foi observada reação cruzada com *L. brasiliensis* com a utilização dos dois antígenos testados de *L. infantum*. Apesar

desse achado, os autores apontaram como alternativa o uso dos antígenos recombinantes como forma alternativa para o diagnóstico da LV, por apresentar menores chances de reações cruzadas com outros agentes.

Antígenos solúveis de *Leishmania* (SLA), obtidos através de ultracentrifugação e diálise, fornecem melhores resultados por serem mais específicos e muito imunogênicos (Reis e Coura-Vital, 2007). Assis e colaboradores (2010) compararam métodos diagnósticos da LV, utilizando-se ELISA-SLA, RIFI, a histoquímica corada por HE e a imunoistoquímica (IHQ) em tecidos, como o baço, linfonodo e fígado, e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para comparar e confirmar os resultados negativos e inconclusivos obtidos pelos outros métodos citados. Para tanto, foram utilizados 34 cães diagnosticados como sorologicamente positivos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da região. Os resultados mostraram que, dentre os métodos utilizados, com exceção do PCR, o ELISA-SLA apresentou maior índice de positividade (65%), sendo esse índice maior entre os cães polissintomáticos (92%), seguida pelos oligossintomáticos (57%) e assintomáticos (12,5%). O índice de positividade do ELISA-SLA foi superado pela técnica de PCR, cujo valor foi de 97%.

Ainda considerando a necessidade de se obter testes imunoenzimáticos com maior potencial diagnóstico e prognóstico, Palatnik-de-Souza et al. (1995) avaliaram a utilização, através de ELISA, de uma fração glicoprotéica, presente na membrana de promastigotas e amastigotas de *Leishmania donovani*, denominada fucose-manose-ligante (FML). Foram testados soros de pacientes acometidos pela LV e os resultados mostraram 100% de sensibilidade e 96% de especificidade, além de ter sido possível identificar positividade entre os pacientes sem evidências clínicas da doença, que por meses subsequentes

desenvolveram doença grave. Não foram detectadas reações cruzadas em pacientes infectados com outras espécies de *Leishmania* ou acometidos por doença de Chagas, mostrando ser o ELISA-FML método útil no diagnóstico da LV, principalmente em pacientes sem a doença aparente, mas com grande risco de desenvolvê-la.

Estudos posteriores avaliaram o diagnóstico e o prognóstico da LV em cães do Rio Grande do Norte, Brasil, utilizando-se ELISA-FML. Os resultados foram comparados a outros métodos, como ELISA e RIFI com antígenos de promastigota de *L. mexicana* em animais infectados com *L. infantum*, vacinados com vacina-FML e infectados por outros agentes. Observou-se que o ELISA-FML não mostrou reação cruzada com outras doenças, sendo altamente específico e sensível no diagnóstico da LV. Comparativamente ao ELISA e à RIFI com antígenos de *L. mexicana*, o ELISA-FML conseguiu detectar de forma mais eficiente anticorpos em animais assintomáticos, positivos para a doença. Foi avaliado o valor preditivo dos testes através da análise sorológica de cães controle negativo e de cães vacinados que foram inoculados com amastigotas de *L. donovani*, e de cães assintomáticos. Encontrou-se 100%, 43% e 24% de valor preditivo para ELISA-FML, ELISA-*L. mexicana* e RIFI, respectivamente (Borja-Cabrera et al., 1999).

1.7.3 qPCR

A qPCR é baseada na detecção e quantificação em tempo real de uma região específica do material genético do parasito, determinadas diretamente pela proporção da emissão de fluorescência. Os sinais de fluorescência requeridos para detecção podem ser obtidos pela marcação dos “*amplicons*” com corante fluorescente. A quantificação através da incorporação do

corante fluorescente na dupla-fita do DNA permite a definição aproximada do ciclo de PCR em que o produto começou a ser formado (Threshold cycle) e por inferência, a quantificação precisa de DNA presente no início da reação (Quaresma, 2007).

Técnicas biomoleculares empregando a PCR são utilizadas amplamente no diagnóstico definitivo a LV ou no diagnóstico de casos suspeitos ou não elucidados por outras metodologias (Moreira et al., 2007; Tasca et al., 2009; Assis et al., 2010; De Queiroz et al., 2010; Ramos et al., 2012). Amostras obtidas de vários tecidos podem ser analisadas, sob diferentes protocolos, sendo aspirados de linfonodo e medula óssea os que apresentam maior sensibilidade diagnóstica, principalmente na detecção de animais infectados, com ausência de sinais clínicos da doença (Moreira et al., 2007). A utilização de amostras de *swab* conjuntival, obtidas principalmente de animais apresentando sinais oculares compatíveis com LV, permite obter maior taxa de resultados positivos, comparativamente à utilização de amostras de sangue total (Martínez et al., 2011).

A qPCR envolve a detecção e a quantificação do parasito em tempo real, sendo extremamente útil nos casos de resultados inconclusivos no ELISA, ou quando não ocorreu ainda soroconversão, resultando em resultados falso-negativos pelo imunoensaio, para monitoramento do tratamento (Martínez et al., 2011). Ramos et al. (2012) avaliaram de forma comparativa a PCR convencional (cPCR) e a qPCR, utilizando-se amostras de medula óssea, linfonodos e fragmento de baço, provenientes de animais naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Os resultados mostraram que o método quantitativo apresentou melhor desempenho, pois foi capaz de detectar número maior de cães positivos, o que não ocorreu com a PCR convencional. Nesse

mesmo estudo, não houve diferença significativa quanto à detecção de DNA do parasito quanto aos diferentes tecidos utilizados no diagnóstico.

Solcà et al. (2012), não notaram diferença estatística entre o desempenho dos testes cPCR e qPCR, utilizando-se fragmentos esplênicos de cães naturalmente infectados, provenientes de região endêmica da Bahia, Brasil. Apesar da qPCR fornecer quantificação precisa do DNA do parasito nas amostras, ela não melhorou significativamente o diagnóstico da LV, quando comparado ao desempenho da cPCR, mas ambos se mostraram mais eficientes em detectar animais positivos para LV do que métodos sorológicos, como o ELISA. A qPCR apresenta valor preditivo positivo maior que testes sorológicos empregados no diagnóstico da LVC, como o ELISA (Martínez et al., 2011).

2- HIPÓTESES

Cães sorologicamente positivos para LV, provenientes de área endêmica para doença, infectam grande número de fêmeas de *L. longipalpis*, apresentam elevadas concentrações de anticorpos anti-SLA e grande infectividade medular para *Leishmania infantum*, determinadas por qPCR.

Cães vacinados com Leishmune[®], provenientes de área endêmica para LVC, não infectam fêmeas de *L. longipalpis*, apresentam elevada concentração de anticorpos anti-FML e possuem baixa infectividade da medula óssea para *L. infantum*, determinada por qPCR.

3- OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar e comparar os resultados obtidos no xenodiagnóstico, nos testes sorológicos ELISA-SLA e ELISA-FML, e na qPCR,

obtidos de cães com anticorpos anti-*Leishmania* e de cães vacinados com Leishmune[®].

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar clinicamente os cães em estudo e categorizá-los em subgrupos, de acordo com sinais clínicos compatíveis com LVC.
- Avaliar a capacidade e grau de infecção de vetores *L. longipalpis* a *L. infantum*, alimentados em cães com anticorpos anti-*Leishmania* e de cães vacinados com Leishmune[®].
- Determinar a concentração de anticorpos totais anti-*Leishmania* spp. ao ELISA-SLA e ELISA-FML dos animais em estudo.
- Realizar qPCR com iniciadores específicos para *Leishmania* spp., em amostras de medula óssea, obtidas dos animais em estudo.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Setenta e nove cães, de raças variadas, de ambos os sexos, residentes em Belo Horizonte e região metropolitana foram categorizados em dois grupos de estudo: grupo 1- cães com anticorpos anti-*Leishmania* (CL), e grupo 2- cães vacinados com Leishmune[®] (CV).

Os critérios para inclusão dos cães no grupo CL foram: cães apresentando resultado sorológico reagente na técnica de ELISA e reagente 1/40 ou 1/80 na técnica de RIFI para LV, obtido de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Fundação Nacional de Saúde (Brasil, 2001). Para o grupo CV foram: cães hígidos, vacinados com Leishmune[®], em esquema inicial de três doses, com intervalo de 21 dias entre elas e reforço anual de, pelo menos, um ano após primeira dose.

Cães apresentando alguma doença que pudesse interferir nos resultados do estudo, ou cães que tivessem sido tratados com qualquer medicamento, trinta dias antes do início do estudo, foram excluídos do grupo CV.

Todos os procedimentos com os cães foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA UFMG, processo nº 32/2011) e explicitamente permitidos pelos proprietários.

Após a conclusão do estudo, todos os animais vacinados retornaram à rotina habitual. Os animais soropositivos foram eutanasiados, tão logo a coleta de material necessário à pesquisa, seguindo as normas dispostas pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), segundo a resolução Nº 714, de 20 de junho de 2002.

Os dados referentes às informações individuais e exame clínico dos animais foram relatados em formulários específicos, chamados DCF (*Data Capture Form*) A e B (ANEXO A).

4.2 Avaliação clínica

Os cães foram avaliados clinicamente, atentando-se ao estado geral, à obtenção dos parâmetros vitais, como frequências cardíaca e respiratória, pulso e temperatura retal, à coloração de mucosas, à avaliação de linfonodos e às particularidades observadas por sistema acometido.

Os animais foram categorizados em três subgrupos de acordo com a presença ou ausência sinais clínicos observados durante o exame físico, de acordo com Mancianti et al. (1989), em três subgrupos: cães sintomáticos (CS), cães oligossintomáticos (CO) e cães assintomáticos (CA).

4.3 Vetores *L. Longipalpis*

Foram utilizados flebotomíneos de *L. longipalpis* de colônia fechada, mantida no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, iniciada a partir de flebotomíneos coletados na cidade de Teresina, Piauí (Brasil). Os adultos empregados neste estudo foram criados segundo a metodologia e condições descritas por Modi e Tesh (1983). Na manutenção rotineira da colônia, as fêmeas foram alimentadas com sangue de hamster (*Mesocricetus auratus*) e as larvas

receberam dieta descrita por Modi e Tesh (1983), modificada por Gontijo (Comunicação Pessoal, 2011). O insetário foi mantido à temperatura de 27°C com umidade relativa de aproximadamente 80 % e os insetos mantidos em miniaturas de armadilhas CDC (Center for Disease Control) (Fig. 3).

Cerca de 30 machos foram alocados em armadilhas juntamente a cerca de 50 fêmeas, para estimulá-las à hematofagia. Foi fornecida diariamente aos flebotomíneos solução de sacarose 10%.



Figura 4- Miniaturas de armadilhas CDC (Center for Disease Control). Fonte: Arquivo pessoal.

4.4 Xenodiagnóstico

4.4.1 Alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* em cães

Para a alimentação nos cães, os insetos foram colocados em recipiente de PVC, idealizado por Costa Val (2007), denominado *flebocontainer* (Fig. 4). Este consiste de um recipiente de PVC semitransparente, de 10 cm de altura por

8,7 cm de diâmetro, coberto com tampa rosqueada de 10 cm de diâmetro, onde existe uma tela de nylon de 80 “mesh” por cm², presa através de cola de silicone.

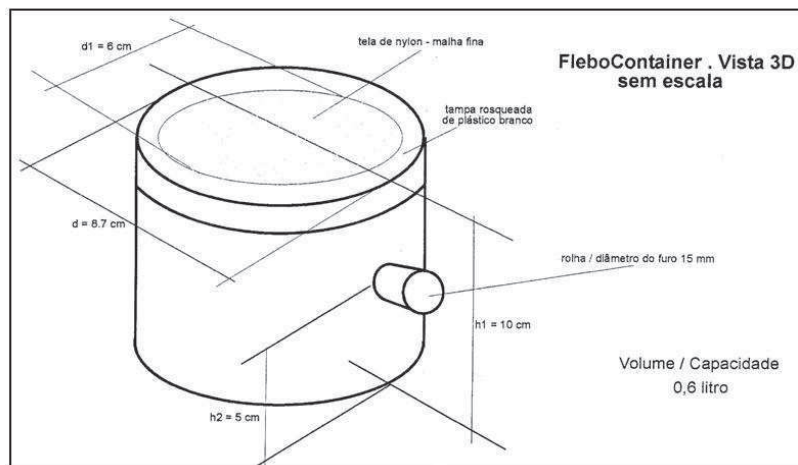


Figura 5- Flebocontainer, aparato utilizado para manutenção dos flebotomíneos para xenodiagnóstico nos cães em estudo, desde a alimentação até a transferência para miniaturas de armadilhas CDC (Center for Disease Control). Fonte: Costa Val (2007).

Foram utilizadas de 25 a 38 fêmeas por animal e número semelhante de machos com cinco dias de emergência. O *flebocontainer* foi colocado através da parte da tela de nylon diretamente em contato com a pele da porção mediana da orelha direita dos cães (Fig. 5) (Travi et al., 2001), previamente sedados com acepromazina a 0,2% (Acepram, Univet, Brasil) na dose de 0,05 mg/kg, associada ao citrato de fentanila a 0,05mg/mL (Fentanest, Cristalia,

Brasil) na dose de 0,1mL/Kg, ambos por via intramuscular. O tempo de exposição aos flebotomíneos foi de 40 minutos em ambiente escuro. Após a alimentação, os flebotomíneos foram mantidos em miniaturas de armadilhas CDC por sete dias, em condições de manutenção da colônia descritas anteriormente. Os dados referentes ao xenodiagnóstico foram alocados no DCF C, conforme ANEXO A



Figura 6- Exposição do animal às fêmeas de *L. longipalpis*. Fonte: Arquivo pessoal.

4.4.2 Dissecção das fêmeas de *L. longipalpis*

Sete dias após o repasto sanguíneo, as fêmeas alimentadas foram dissecadas com auxílio de estereoscópio (Labimex, PZO) sobre uma gota de solução salina 0,9%, com material apropriado (fig. 6). O intestino foi retirado pela porção posterior do abdômen, com auxílio de haste de resina epóxi, com agulha em uma das extremidades e, sobre ele, foi colocada uma lamínula. Do total de fêmeas dissecadas por animal, foi determinada a quantidade de fêmeas infectadas e não infectadas, bem como a intensidade da infecção, expressa em cruces, que variou de uma a quatro, sendo que nessa última categoria, as promastigotas formaram estruturas denominadas rosáceas, conforme descrito no Quadro 1. A avaliação da intensidade parasitária foi realizada sob aumento de 400 x em microscópio óptico (Olympus® Cx40, Japão).

As anotações referentes ao xenodiagnóstico foram alocadas em formulários próprios (DCF C e DCF E), conforme ANEXO A.

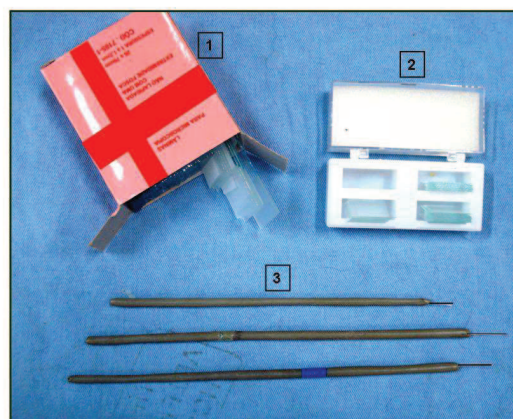


Figura 7- Materiais utilizados na dissecção de fêmeas *L. longipalpis*: (1) lâmina de microscopia, (2) lamínulas e (3) hastes de resina epóxi, com agulha em uma das extremidades. Fonte: Arquivo pessoal.

Resultado do xenodiagnóstico	Intensidade parasitária	Simbologia
Negativo	Ausente	-
Discreta carga parasitária	Discreta	+
Média carga parasitária	Moderada	++
Acentuada carga parasitária	Acentuada	+++
Acentuada carga parasitária com formação de rosáceas	Acentuada com rosáceas	++++

Quadro 1- Relação entre resultado do xenodiagnóstico, intensidade parasitária intestinal observada em *L. longipalpis* e simbologia utilizada para caracterizar a carga parasitária intestinal.

4.5 Exames laboratoriais

4.5.1 Coleta de Material

Após exame clínico completo nos cães, procedeu-se a coleta de sangue para realização de teste sorológico, pelo método ELISA. Foram coletados cerca de 2,0mL de sangue por animal, armazenados em frasco sem anticoagulante, para obtenção de soro. O material coletado foi levado à centrifuga (Fanem®, Brasil) por 10 minutos a 3.000 rpm. O soro foi aliqotado e armazenado em frascos tipo *ependorf* de 0,5 mL,

ficando estocados a -20°C até o momento de sua utilização.

Em seguida, os animais foram sedados utilizando-se acepromazina a 0,2% (Acepram, Univet, Brasil) na dose de 0,05 mg/kg, associada ao citrato de fentanila a 0,05mg/mL (Fentanest, Cristalia, Brasil) na dose de 0,1mL/Kg, ambos por via intramuscular, para coleta de medula óssea. Adicionalmente, foi realizada anestesia local do manúbrio, por infiltração anestésica com lidocaína 2% (Hipolabor,

Brasil). Passados 10 minutos, introduziu-se agulha de 40x12 gauges, já acoplada à seringa de 10 ml. O material medular obtido foi rapidamente transferido para lâminas de microscopia, para confecção de esfregaços por aposição, de maneira que fossem confeccionadas três lâminas por animal. Uma alíquota de medula óssea aspirada foi acondicionada em frascos tipo *ependorf* de 1,5 ml e armazenada a -20°C, para realização de qPCR.

4.5.1 ELISA-SLA

A detecção de anticorpos IgG total anti-*Leishmania*, nos soros dos animais em estudo foi realizada pelo método de ELISA de acordo com a técnica descrita por Voller et al. (1979), com modificações: os antígenos utilizados foram produzidos a partir de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* cepa MHOM/BR/1967/BH46. Estas foram centrifugadas a 250g (Hermle Z 323K, Alemanha), por dez minutos a 40°C, ressuspendidas em PBS e submetidas à ruptura por ultra-sonografia a 25 ω por 45 segundos, cinco vezes (BRANSON 1510®, Branson Ultrasonics Co., EUA). A quantidade de proteína obtida foi dosada através do método de Lowry (Lowry et al., 1951) e ajustada para 20μg/mL em PBS, sendo armazenado à -20°C em alíquotas até o momento do uso. O conjugado utilizado foi antimunoglobulina de cão, IgG obtida de soro imune de coelho, marcada com Peroxidase VI (Sigma P.6782), na diluição 1:7000.

Foram utilizadas microplacas de polietileno (Inlab, p-0299) de 96 orifícios e fundo plano. Cada orifício das microplacas foi sensibilizado com 2μg do antígeno diluídos em 100μL de tampão carbonato, seguindo-se um período de 24 horas para ocorrer a adsorção do antígeno às paredes de cada orifício. Após, retirou-se o excesso de antígeno através de lavagem (Lavadora de

microplacas MW-12A, Bioclin, Brasil) da placa, por uma vez, com solução de lavagem. Foram adicionados 150μL de solução de bloqueio de sítios inespecíficos em cada orifício, seguindo-se incubação por 30 minutos a 37°C. Passado o tempo, retirou-se o excesso de solução de bloqueio com duas lavagens sucessivas. Os soros foram diluídos em tampão de incubação. Foram aplicados 100μL da solução diluída em cada orifício, sendo utilizada a diluição 1:100. Seguiu-se incubação por 45 minutos a 37°C e retirada do excesso do soro diluído por uma série de quatro lavagens. O conjugado foi diluído a seu título e 100μL desta diluição foi acrescentada em cada orifício. Após nova incubação por 45 minutos a 37°C, o excesso de conjugado foi retirado por nova série de quatro lavagens. A solução do substrato foi então preparada e 100μL dela acrescentados em cada orifício. A reação ocorreu por 10 minutos a 37°C, quando foi interrompida pela adição de 25μL de H₂SO₄ 4N (Merck, Alemanha) em cada orifício. Após todas as lavagens, o excesso de líquido foi retirado por inversão em papel absorvente.

As leituras das reações foram realizadas em leitor de ELISA (Leitor de microplacas MB-96A, Bioclin, Brasil) a 495nm. Os resultados foram expressos em valores de absorbância. Para cada placa o ponto de corte (cut-off) foi estabelecido através da criação de curva ROC (Curvas Características de Operação do Receptor). Foram determinados os animais positivos e negativos, divididos entre os grupos.

As soluções utilizadas na execução da técnica bem como seu preparo estão disponibilizados no ANEXO C.

4.5.2 ELISA-FML

A detecção de anticorpos IgG total anti-*Leishmania* nos soros dos animais em estudo foi determinada também com a realização de ELISA-FML, segundo

metodologia descrita por Palatinik-de-Souza et al. (1995), com modificações.

O isolamento, caracterização química e dosagem protéica do antígeno FML foram fornecidos pelo laboratório Pfizer[®]. O conjugado utilizado foi o mesmo anteriormente descrito para a técnica de ELISA-SLA.

Foram utilizadas microplacas de polietileno (Falcon[®], BD Laboratory., USA) de 96 orifícios e fundo plano. Cada microplaca foi sensibilizada com 50µL de antígeno FML a 40µg/mL (2µg/poço) diluídos em tampão carbonato bicarbonato, por uma hora a 37°C, seguindo um período de 12 a 27 horas a 4°C. Após o período de sensibilização, o excesso de antígeno foi retirado por meio de cinco lavagens com PBS-Tween contendo 1% de leite em pó desnatado (PBS*), utilizando pipeta multicanal. Ao final de cada lavagem, a microplaca foi seca sobre papel absorvente e mantida em geladeira até o término da diluição dos soros. Os soros foram adicionados em duplicatas, 50 µL por poço, diluídos 1/100 em PBS*. Seguiu-se incubação por uma hora a 37°C, com posterior série de cinco lavagens, com PBS*, como já descrito. O conjugado foi adicionado, 50µL por poço, previamente diluído a seu título em PBS*. A placa foi incubada por uma hora a 37°C, com posterior série de cinco lavagens com PBS*. Finalizou-se com adição de solução do substrato. A reação ocorreu em ambiente escuro, durante 30 minutos. Dado o tempo, a reação foi interrompida por adição de 10µL de ácido sulfúrico 1N. A leitura foi feita no leitor de ELISA (BioRad. Modelo 550, Brasil) com filtro 495nm. Para cada placa o ponto de corte (cut-off) foi estabelecido através da criação de curva ROC (Curvas Características de Operação do Receptor). Foram determinados os animais positivos e negativos, distribuídos entre os grupos. As absorbâncias obtidas foram alocadas no DCF H, conforme ANEXO A..

As soluções para a execução da técnica foram preparadas como descrito no ANEXO C.

4.6 qPCR

4.6.1 Extração do DNA

A extração do DNA de *Leishmania* sp. foi realizada com uso de fenol-clorofórmio. Utilizaram-se 100µL da amostra para 200µL de tampão de lise e 30 µL de solução de proteinase K 10mg/ml, que foram alocados em tubos tipo eppendorf e homogeneizados. A solução foi incubada em termobloco (Termobloco fine PCR ALB 64) a 56°C ± 2°C por uma hora. Após a digestão, o material foi incubado novamente a 95°C ± 2°C por 10 minutos, para desnaturação enzimática. Passado o tempo, o material foi centrifugado e a ele foram adicionados 300 µL de solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1. A solução foi agitada em vortex (Biomixer QL-901) por um minuto e depois centrifugada por 5 minutos a 1300 ± 200rpm. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo estéril de 2,0mL, seguindo o ciclo anteriormente citado, com solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1. O sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril de 2,0mL, contendo 300µL de solução clorofórmio: álcool isoamílico 24:1. O frasco foi agitado em vortex por um minuto e centrifugado por 5 minutos a 1300 rpm ±200rpm. O sobrenadante foi transferido para outro frasco estéril de 2,0 mL, contendo 900µL de etanol absoluto e, à solução, foram acrescentados 30µL de solução de acetato de amônio 3M. O material foi incubado em gelo por 10 minutos, *overnight* entre -5 e -25°C. Retirado o material do gelo, o mesmo foi centrifugado por 5 minutos a 1300 ± 200rpm. O sobrenadante foi descartado e o excesso de etanol foi retirado com papel toalha. O tubo foi deixado em temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos,

ou até a evaporação total do etanol. O pellet formado no tubo foi ressuscitado em 100µL de tampão eluição (TE). O tubo com o *pellet* foi incubado por alguns minutos a 60°C, para auxiliar na sua solubilização. O frasco contendo o DNA foi estocado a -70°C até a realização de sua amplificação.

As soluções utilizadas na extração do DNA estão listadas no ANEXO D.

4.6.2 Amplificação do DNA

No caso da PCR em tempo real, não há a necessidade do gel de eletroforese, uma vez que a reação ocorre em termociclador que permite a mensuração da fluorescência na medida em que a reação ocorre, sendo essa fluorescência proporcional ao material genético amplificado. Para que isso ocorra, são empregadas sondas específicas para o fragmento alvo, marcadas com fluoróforos. Durante a amplificação do DNA, essas sondas se ligam ao fragmento desejado, sendo inativadas enzimaticamente, ocorrendo emissão de fluorescência (Scheffe et al., 2006).

As etapas da reação foram realizadas em ambientes separados, a fim de se evitar contaminação da reação. A mistura da reação contendo o DNA amostral foi preparada conforme os reagentes e o volume indicados no Quadro 1, totalizando o volume final de 20µL. A mistura contendo β-actina foi preparada com 10µL de acordo com o descrito no Quadro 2, totalizando um volume final de 10µL. Os

iniciadores utilizados para amplificação com β-actina foram: *forward* (F): 5'CTGGCACCACACCTTCTACAA 3' e *reverse* (R): 5' GCCTCGGTCAGCAGCA 3'. As amostras foram analisadas em duplicata, para efeito de reprodutibilidade. A realização da PCR, bem como a determinação da sensibilidade, especificidade e linearidade do ensaio, utilizando tecnologia TaqMan foi obtida conforme descrito por Francino et al. (2006), com modificações.

As soluções foram distribuídas em placas MicroAmp® Optical (Applied Biosystems, EUA) de 96 poços, que foram seladas com selante óptico (Applied Biosystems, EUA). As placas foram transportadas à área de automação e colocadas em termociclador StepOne Plus® (Applied Biosystems, EUA), para a reação. As condições ótimas para a amplificação do DNA foram as seguintes: 50°C por dois minutos, 95°C por 10 minutos, momento no qual ocorreu crescimento exponencial do produto de PCR; e 45 ciclos intercalados de 15 segundos a 95°C e um minuto a 60°C. Finalizada a reação, determinou-se a quantidade de cópias de DNA de *Leishmania* sp/ mL de medula óssea, presentes em cada amostra, tendo-se como padrão, os resultados encontrados na curva de calibração.

Os animais dos grupos CI e CV foram categorizados de acordo com a intensidade da carga parasitária, conforme descrito no Quadro 3

Reagente	Concentração	Quantidade (µL)
Taq Man Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, EUA)	10x	10
Assay -KND2 -ANY- Custom TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystem, EUA)	20x	1µL
Água milliqui	—	7µL
DNA genômico	—	2µL

Quadro 2- Relação dos reagentes e sua quantidade utilizada no preparo da mistura contendo kDNA.

Reagente	Concentração	Quantidade (µL)
Taq Man Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, EUA)	2x	5
Primer β-actina R	10 pmol/µL	0,1
Primer β-actina F	10 pmol/µL	0,1
TaqMan MGB Probe Vic	10 pmol/µL	0,25
Água milliqui	—	2,55
DNA genômico	—	2

Quadro 3- Relação dos reagentes e sua quantidade utilizados no preparo da solução de β-actina.

Resultado de qPCR	Cópias de DNA de <i>Lesihmania</i> /mL de medula óssea
Negativo	0
Baixa positividade	0 - 100
Média positividade	100 - 1.000
Alta positividade	1.000 - 10.000
Intensa positividade	> 10.000

Quadro 4- Relação entre o resultado de qPCR e o número de cópias de DNA de *Lesihmania*/mL de medula óssea (Martínez et al., 2011).

4.7 Análise estatística

Os resultados foram analisados de acordo com a natureza dos dados, sendo os não paramétricos avaliados pelos testes Mann-Whitney e Kolmogorov and Smirnov, enquanto aqueles paramétricos, pelo teste T

de Student não pareado. Correlação entre alguns parâmetros também foi estabelecida, utilizando-se o método de Spearman, com intervalo de confiança de 95%. Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo programa InStat (Graphpad, Estados Unidos).

5- RESULTADOS

5.1 Categorização clínica

De acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos compatíveis com LVC, os animais dos grupos CL e CV foram divididos em três subgrupos: sintomáticos (CS/CL e CS/CV), oligossintomáticos (CO/CL e CO/CV) e assintomáticos (CA/CL e CA/CV).

Dos 33 animais do grupo CL, 21 (63,6%) foram sintomáticos (CS/CL), sendo as dermatopatias o principal sinal observado, estando presente em 90,5% dos cães. Em seguida, observou-se linfadenopatia (81%) e esplenomegalia (76,2%). No subgrupo CO/CL, foram alocados 11 cães (33,3%), cujo principal sinal foi linfadenopatia (91%), seguida de dermatopatias (54,5%). Apenas um (3,0%) foi categorizado como assintomático (CA/CL).

Dos 46 animais do grupo CV, apenas um (2,0%) foi identificado com três sinais clínicos sugestivos da doença, sendo classificado como CS/CV: estado geral ruim, emagrecimento, mucosas hipocoradas e alopecia. O subgrupo CO/CV totalizou 17 cães (37,0%), sendo os principais sinais observados: esplenomegalia (77,8%) e linfadenopatia (5,6%). No subgrupo CA/CV, 27 foram alocados 27 animais (58,6%).

5.2 Xenodiagnóstico

No grupo CL, do total de 32 animais, foram dissecadas, em média, 31,5 (\pm 8,8) fêmeas de *L. longipalpis* por animal. O xenodiagnóstico de 22 (68,7%) cães foi positivo. Nos animais dos grupos CS/CL e CO/CL, 76% (16/21) e 54% (6/11) dos cães foram aptos a infectar fêmeas, respectivamente. O resultado do xenodiagnóstico de CA/CL foi negativo.

Cerca de 28% e 25% das fêmeas dissecadas para o grupo CL tiveram intensidade parasitária intestinal moderada e acentuada, respectivamente. As fêmeas alimentadas em CS/CL (38%) tiveram, predominantemente, infecção moderada e as alimentadas em CO/CL (30%), acentuada. Foi observada intensidade parasitária acentuada com formação de rosáceas em fêmeas alimentadas em dois cães sintomáticos (9%) (Fig. 7). As formas parasitárias predominantemente encontradas, à visualização microscópica do intestino das fêmeas de *L. longipalpis*, foram morfológicamente semelhantes às promastigotas metacíclicas, apresentando-se muito móveis, com corpo celular fino e flagelo longo (Fig. 7).

No grupo CL, não foi possível realizar xenodiagnóstico em um animal, pois não houve fêmeas suficientes para dissecação.

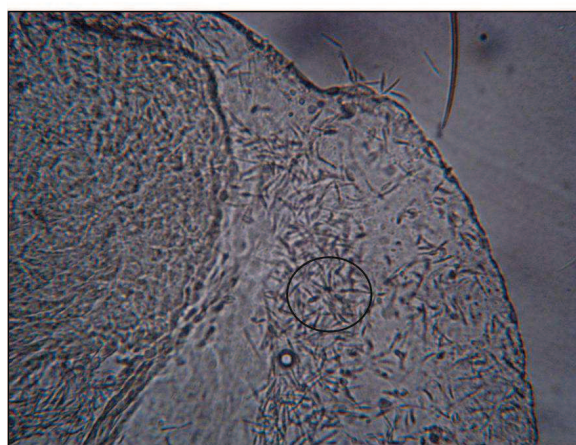


Figura 8- Visualização microscópica do intestino de *L. longipalpis*, alimentada em CL (cães com anticorpos anti-*Leishmania*), evidenciando formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum*. Em destaque, evidencia-se a presença de rosáceas, mostrando infecção acentuada pelo parasito. Fonte: arquivo pessoal.

Já no grupo CV, o número de fêmeas dissecadas por animal foi inferior ao de CL, sendo utilizadas em média 26 (\pm 12,5). Dos 42 animais, detectou-se positividade em 15 (35,7%), sendo 8 (34,7%) CA/CV e 7

CO/CV (38,8%). A maioria das fêmeas de *L. longipalpis* dissecadas alimentadas em CV (31%) teve discreta intensidade parasitária intestinal. Apenas um animal (7%) apresentou xenodiagnóstico com intensidade moderada. O xenodiagnóstico de CS/CV mostrou-se negativo.

As formas parasitárias visualizadas no tubo digestivo dos flebotomíneos alimentados em CV, foi semelhante às promastigotas paramastigotas, com formato de pêra, morfologicamente diferente às observadas no intestino de *L. longipalpis* alimentada em CL (Fig. 8)

No grupo CV, o xenodiagnóstico não pode ser concluído em quatro animais (8,6%),

sendo todos CA, pelo fato de não haver fêmeas suficientes para a dissecação.

Houve diferença estatística significativa ($p < 0,01$) entre a quantidade de fêmeas infectadas observadas em CL em relação às fêmeas infectadas de CV. Os valores médios e desvio padrão em relação à quantidade de fêmeas dissecadas e infectadas por animal estão relacionados na Tab. 1, distribuídos entre grupo e categoria clínica.

Não houve diferença significativa entre a quantidade de fêmeas infectadas alimentadas em CS e CO de CL. Não foi detectada diferença estatística significativa também entre os subgrupos de CV.

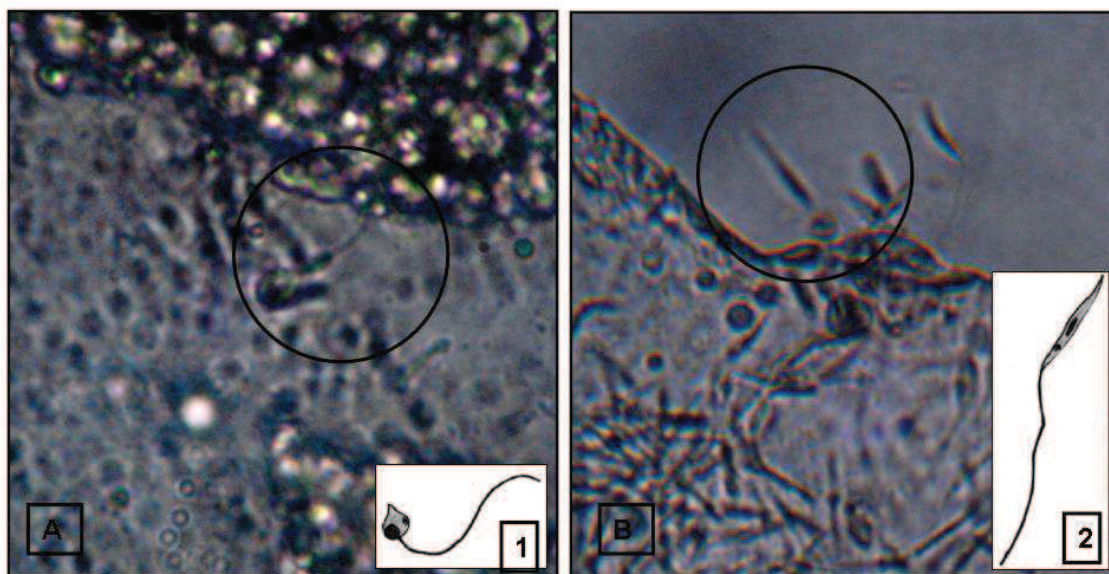


Figura 9- Fotos dos morfotipos de *L. infantum* visualizados no intestino de *L. longipalpis*. A- Destaque do morfotipo visualizado em fêmea alimentada em CV (cães vacinados com Leishmune[®]), sendo morfologicamente semelhante à promastigota paramastigota, representada em desenho esquemático (1). Destaque do morfotipo visualizado em fêmea alimentada em CL (cães com anticorpos anti-*Leishmania*), sendo morfologicamente semelhante à promastigota metacíclica, representada no desenho esquemático (2) Fonte: arquivo pessoal.

Tabela 1- Média e desvio padrão da quantidade de fêmeas de *L. longipalpis* dissecadas e infectadas por grupo e subgrupo de CL e CV.

	CL				CV	
	CS (n=21)	CO (n=11)	CA* (n=1)	CS* (n=1)	CO	CA
Fêmeas dissecadas/animal	31,3 ^{Aa} ± 7,3	34,1 ^{Aa} ± 5,1	38	15	28,8 ^{Ab} ± 10,5	28,0 ^{Ab} ± 9,8
Fêmeas infectadas/animal	9,2 ^{Aa} ± 9,2	7,9 ^{Aa} ± 7,9	0	0	1,5 ^{Bb} ± 1,6	1,0 ^{Bb} ± 2,5

CL: cães infectados; CV: cães vacinados; CS: cães sintomáticos; CO: cães oligossintomáticos; CA: cães assintomáticos; n: número de animais.

Letras maiúsculas que se diferem referem-se à comparação dos subgrupos entre cada grupo, por meio do teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Letras minúsculas que se diferem se referem à comparação dos subgrupos dentro cada grupo por meio do teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

5.3 ELISA-SLA

O ELISA-SLA não foi avaliado em dois animais do subgrupo CS/CL, pelo fato das amostras apresentarem-se com hemólise relevante. Evidenciou-se positividade em 71% (22/31) de CL. Dos 19 cães de CS/CL e dos 11 de CO/CL, 16 (84,2%) e cinco (45,4%) apresentaram resultado positivo ao teste, respectivamente.

Não houve diferença significativa entre os resultados de ELISA-SLA para CS/CL e CO/CL. O teste possibilitou identificar como positivo o animal assintomático de CL.

Quanto aos animais do grupo CV, o teste não foi realizado na amostra de dois animais, por apresentar-se com hemólise relevante. Dos 44 cães, 8 (18%) mostraram ser positivos ao ELISA-SLA, sendo cinco do subgrupo CA e três de CO. O animal sintomático apresentou teste negativo.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados sorológicos dos subgrupos CA e CO do grupo CV.

Houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os resultados de CL comparados aos de CV. Os CL mostraram

maior positividade e maiores valores de absorbância ($p < 0,05$) em relação aos CV para o teste.

Os resultados médios das absorbâncias obtidas no ELISA-SLA estão representados na figura 10 e dispostos na Tabela 5.

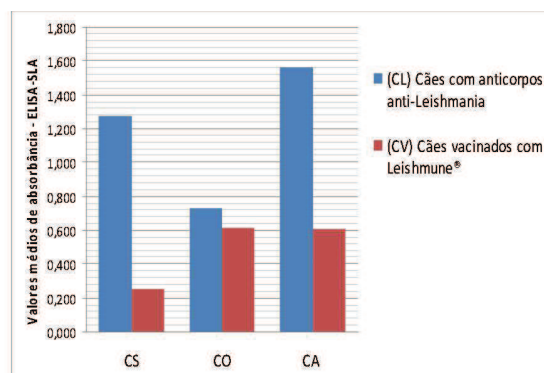


Figura 10- Valores médios de absorbância obtidos à avaliação do ELISA-SLA para os grupos CL (cães com anticorpos anti-*Leishmania*) e CV (cães vacinados com Leishmune®), distribuídos entre os subgrupos CS (cães sintomáticos), CO (cães oligossintomáticos) e CA (cães assintomáticos).

5.4 ELISA-FML

O teste não foi realizado em amostras de dois animais do subgrupo CS de CL e do subgrupo CA de CV, por apresentarem hemólise relevante.

Pelo ensaio imunoenzimático utilizando antígeno FML identificou-se positividade em 83,9% (26/31) de CL. Os CS/CL e CO/CL deste grupo apresentaram 95% (18/19) e 63,6% (7/11) de positividade, respectivamente. O animal assintomático apresentou resultado positivo ao teste.

Não houve diferença estatística significativa quanto à concentração de anticorpos detectadas no subgrupo CS em comparação à do subgrupo CO. Em quatro animais de CL, que tiveram resultados negativos ao ELISA-SLA, tiveram resultados positivos ao ELISA-FML.

Do grupo CV, 52% (23/44) dos animais apresentaram anticorpos IgG totais detectáveis ao teste. Animais assintomáticos apresentaram 72% (18/25) de positividade ao teste, enquanto os oligossintomáticos, 54,5% (6/11). O CS/CV apresentou resultado negativo ao ELISA-FML.

Não houve diferença estatística significativa entre os resultados do ELISA-FML de CS e CO de CL. Não foi constatada diferença estatística quanto aos níveis de anticorpos detectáveis ao teste entre CA/CV e CO/CV.

Não foi detectada diferença estatística quanto à concentração de anticorpos apresentados ao ELISA-FML entre CL e CV, sendo que em ambos os grupos foi detectada elevada concentração de anticorpos anti-FML.

Os valores médios das absorvâncias encontradas no teste estão representados na figura 11 e dispostos na Tabela 5.

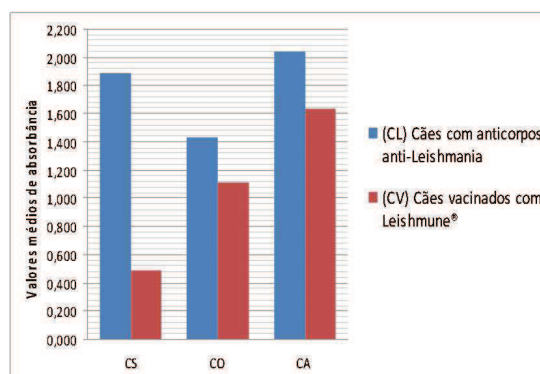


Figura 11- Valores médios de absorvância obtidos à avaliação do ELISA-FML para os grupos CL (cães com anticorpos anti-*Leishmania*) e CV (cães vacinados com Leishmune®), distribuídos entre os subgrupos CS (cães sintomáticos), CO (cães oligossintomáticos) e CA (cães assintomáticos).

Tabela 2- Resultados médios das absorvâncias obtidas ao ELISA-SLA e ELISA-FML e desvio-padrão distribuídos entre os grupos CL e CV e os subgrupos CS, CO e CA.

Grupo/subgrupo	CL (n=31)			CV (n=44)		
	CS (n=19)	CO (n=11)	CA* (n=1)	CS* (n=1)	CO (n=18)	CA (n=25)
ELISA-SLA	1,277 ^{Aa} ± 0,505	0,729 ^{Ba} ± 0,455	1,560	0,255	0,617 ^{Ab} ± 0,321	0,609 ^{Bb} ± 0,360
ELISA-FML	1,884 ^{Aa} ± 0,754	1,435 ^{Ba} ± 0,419	2,041	0,489	1,113 ^{Ab} ± 0,769	1,632 ^{Bb} ± 0,867

CL - cães infectados; CV - cães vacinados; CS - cães sintomáticos; CO - cães oligossintomáticos; CA - cães assintomáticos; n: número de animais.

Letras maiúsculas que se diferem referem-se à comparação dos subgrupos entre cada grupo, por meio do teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Letras minúsculas que se diferem se referem à comparação dos subgrupos dentro cada grupo por meio do teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

*Excluído da análise estatística pela baixa frequência (n=1).

5.5 qPCR

Os resultados de qPCR foram positivos para 93,9% (31/33) do grupo CL, sendo possível constatar parasitismo medular intenso, onde foram detectadas, em média, 78.752.966,92 cópias de DNA de *Leishmania*/mL de medula óssea.

O teste revelou positividade em 95,2% (20/21) dos CS/CS, em 91% (10/11) dos CO/CS e confirmou a presença de *Leishmania* spp. no animal assintomático, em que foi possível detectar 2.495.516 cópias de DNA de *Leishmania*/mL de medula óssea, representando resultado de intensa positividade (> 10.000 cópias de DNA de *Leishmania* /mL) (Fig. 12).

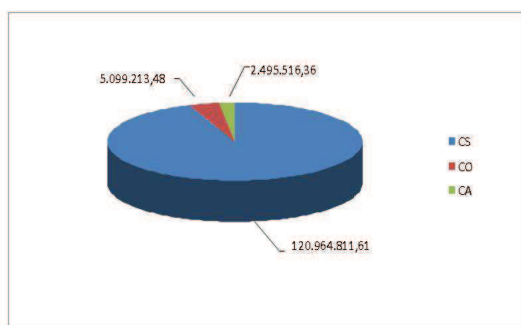


Figura 12- Quantidade média de cópias de *Leishmania*/mL de medula óssea, obtida a qPCR de cães com anticorpos anti-*Leishmania* (CL), distribuída entre os subgrupos CS (cães sintomáticos), CO (cães oligossintomáticos), CA (cães assintomáticos).

Quanto ao grupo CV, o teste detectou parasitos em 36,9% (17/46) dos animais, sendo 47,0% (8/17) representados pelo grupo CA/CV e 52,9% (9/17) pelo grupo CO/CV. A quantidade de parasitos detectados por mL de amostra analisada foi bastante inferior ao grupo CL, com média de 916,2 cópias de DNA de *Leishmania*/mL de medula óssea (Fig. 9).

Considerando os subgrupos CS/CL e CO/CL, não houve diferença significativa em relação à carga parasitária da medula óssea, já que a maioria dos animais (72%) foi categorizada com intensidade parasitária medular intensa (>10.000 cópias de DNA de *Leishmania*/mL).

Quanto ao grupo CV, não houve diferença estatística entre a média de valores de qPCR de CA e CO. A qPCR de CS/CV não detectou parasitos na amostra de medula óssea avaliada.

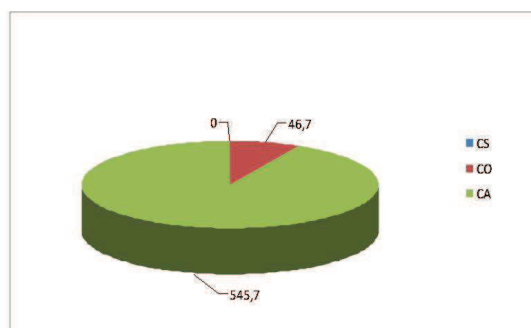


Figura 13- Quantidade média de cópias de *Leishmania*/mL de medula óssea, obtida a qPCR de cães vacinados com Leishmune® (CV), distribuída entre os subgrupos CS (cães sintomáticos), CO (cães oligossintomáticos), CA (cães assintomáticos).

Houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação à intensidade parasitária medular, comparando-se o grupo CL e CV, em que foi possível observar que CL apresentou carga parasitária medular significativamente superior à de CV.

Os valores médios (X) e desvio padrão (SD) da quantidade de cópias de DNA de *Leishmania*/mL de medula óssea, obtida a qPCR, estão dispostos por grupo e subgrupo na Tabela 3.

Tabela 3- Quantidade média de cópias de DNA de *Leishmania*/mL de medula óssea, obtida pela técnica de qPCR, e desvio padrão distribuídos entre grupos CL e CV e seus subgrupos CS, CO e CA.

Grupo Subgrupo	CL			CV		
	n	X	SD	n	X	SD
CS	21	120964811,6 ^{Aa}	395837702,6	1*	0,0	0,0
CO	11	5099213,48 ^{Aa}	12307799,72	18	47,6 ^{Bb}	153,9
CA	1*	2.495.516,36*	0,0	27	545,7 ^{Bb}	2803,6

CL - cães infectados; CV - cães vacinados; CS - cães sintomáticos; CO - cães oligossintomáticos; CA - cães assintomáticos; n: número de animais; X: média; SD: desvio-padrão.

Letras maiúsculas que se diferem referem-se à comparação dos subgrupos entre cada grupo, por meio do teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Letras minúsculas que se diferem se referem à comparação dos subgrupos dentro cada grupo por meio do teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

*Excluído da análise estatística pela baixa frequência (n=1).

5.6 Correlação entre resultados para os grupos e subgrupos de CL e CV

Não foi detectada correlação entre a categoria clínica de CL e a quantidade de fêmeas infectadas por *L. infantum*, e nem entre a concentração de anticorpos anti-SLA detectada no grupo. Tanto CS/CL quanto CO/CL são aptos a infectar fêmeas e apresentam elevada concentração de anticorpos detectados ao ELISA-SLA.

Em relação aos anticorpos contra a fração FML, não houve correlação entre sua concentração e a categorização clínica de CL. Ambos os subgrupos apresentaram elevados níveis de anticorpos anti-FML. Não se observou correlação entre a concentração de anticorpos anti-FML e a intensidade de fêmeas infectadas observadas entre os subgrupos de CL.

Com relação à prevalência de sinais clínicos, como dermatopatias e linfadenopatias observadas em CL, não houve correlação quanto à infectividade de *L. longipalpis* e com a concentração de anticorpos anti-SLA

A intensidade da carga parasitária observada na qPCR para CL correlaciona-se positivamente à concentração de anticorpos anti-SLA ($p < 0,05$). Entretanto,

tal observação não foi feita em relação à concentração de anticorpos anti-FML detectada para o grupo.

A intensidade parasitária determinada pela qPCR não mostrou correlação entre a infectividade às fêmeas de *L. longipalpis* para CS/CL e nem para CO/CL.

Considerando o grupo CV, não houve correlações entre nenhum dos parâmetros avaliados para o grupo CL.

6 DISCUSSÃO

Após a infecção dos hospedeiros vertebrados, na ausência de resposta imunológica adequada, formas amastigotas de *Leishmania* spp. invadem vários tecidos do organismo, através de macrófagos, acarretando em espectro de alterações clínicas, que serão evidentes dependendo do sistema acometido (Trotz-Williams e Gradoni, 2003). Nesse estudo, o conjunto de sinais clínicos observados em animais infectados está de acordo com dados observados por diversos pesquisadores, como dermatopatias e linfadenopatias, diferindo apenas com relação à prevalência dos achados (Costa-Val et al., 2007; Aguiar et al., 2007; Sollano-Galego et al., 2009; De Freitas et al., 2012).

Entretanto, considerando a diversidade desses sinais e até mesmo a ausência deles em muitos cães infectados, o diagnóstico da LVC deve ser associado a achados laboratoriais mais específicos (Alvar et al., 2004), principalmente se tratando de animais provenientes de regiões endêmicas. Além disso, em áreas cujo padrão socioeconômico é baixo, outros fatores podem estar associados dificultando o diagnóstico clínico dos cães, especialmente as dermatoses e a desnutrição (Brasil, 2006).

Esse trabalho mostra o quão importante é o emprego de metodologias diagnósticas laboratoriais para se determinar a real situação do animal. No caso de CA/CL, embora tivesse resultado sorológico sabidamente positivo para LV, e tal critério permitisse sua inclusão no grupo CL, se fôssemos considerar apenas a presença ou ausência de sinais clínicos, o cão seria considerado negativo, e sua permanência poderia oferecer riscos a outros potenciais hospedeiros, caso não recebesse tratamento adequado contra a doença. Da mesma maneira, a suspeita de LV em um animal do grupo CV, classificado como sintomático, não foi confirmada pelos testes sorológicos, com emprego de ELISA-SLA e ELISA-FML, e molecular, com a qPCR.

Michalsky et al. (2007) testaram a infectividade de flebotomíneos alimentados em cães naturalmente infectados e detectaram que animais sintomáticos apresentaram taxa de infectividade de flebotomíneos superior (28,4%), quando comparados aos animais oligossintomáticos (5,1%) e aos assintomáticos (5,4%). Soares et al. (2011) verificaram que cães com diferentes sintomatologias clínicas são capazes de infectar flebotomíneos, sendo que a taxa de infecção dos sintomáticos foi superior a dos assintomáticos, representando 13% e 3,5%, respectivamente. Costa-Val et al. (2007) também encontraram correlação positiva

entre a taxa de infecção de flebotomíneos e a sintomatologia apresentada por cães infectados com *L. infantum*, de forma que animais sintomáticos infectaram maior número de fêmeas de *L. longipalpis*, seguidos dos oligossintomáticos e assintomáticos.

Molina et al. (1994), entretanto, verificaram que a taxa de infecção de flebotomíneos a *L. infantum* não teve correlação com a sintomatologia apresentada por cães naturalmente infectados pelo parasito. Guarga et al. (2000) também não encontraram diferença estatisticamente significativa entre taxas de infecção de *Phlebotomus perniciosus* alimentados indiretamente do sangue de animais com diferentes sinais clínicos, sendo que esse achado poderia estar correlacionado à capacidade aumentada, intrínseca à espécie, de sofrer infecção por parasitos, sendo, inclusive, capaz de se infectar através da alimentação em cães assintomáticos (Travi et al., 2001).

Os resultados de xenodiagnóstico para animais infectados obtidos nessa pesquisa estão de acordo com relatos de Molina et al. (1994) e Guarga et al. (2000), que não obtiveram correlação entre a sintomatologia apresentada pelo animal e a capacidade de infectar flebotomíneos. Embora os autores tenham trabalhado com flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*, constatou-se que tanto animais sintomáticos, quanto oligossintomáticos foram capazes de infectar *L. longipalpis*, de forma que foi observado parasitismo intestinal moderado a intenso nos flebotomíneos. Esses achados podem ter correlação com o tipo de colônia a qual pertenciam as fêmeas utilizadas no trabalho, que já estava estabelecida, estabilizada, sendo provenientes de sucessivas gerações, com maior potencial em se infectar. (Guarga et al., 2000). Deve-se considerar ainda que *L. longipalpis* provenientes de regiões geográficas

distintas, podem apresentar capacidade infectiva variável (Travi et al., 2009).

No presente trabalho, não foram detectadas formas promastigotas no intestino dos flebotomíneos alimentados no cão assintomático, assim como observado por Travi et al. (2001). Os pesquisadores constataram que fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas em animais assintomáticos, experimentalmente infectados, não foram capazes de se infectar.

Laurenti et al. (2006), avaliando a transmissibilidade de *L. infantum* a *L. longipalpis*, alimentadas em cães naturalmente infectados, categorizados de acordo com a sintomatologia clínica, constataram que a média de fêmeas infectadas, alimentadas em cães assintomáticos foi superior àquela das alimentadas em cães sintomáticos. Foram utilizados 10 cães sintomáticos e 11 assintomáticos, sendo que a taxa de fêmeas positivas alimentadas em cães assintomáticos foi de 74,6%, contra 52,5% para cães sintomáticos. Talvez, nesse trabalho, o fato de haver apenas um animal categorizado como assintomático, tenha limitado a capacidade de avaliação da transmissibilidade do parasito ao vetor, não sendo possível afirmar categoricamente que esse tipo de animal não seja capaz de infectar vetores. Laurenti e colaboradores (2006) demonstraram que cães assintomáticos oferecem risco potencial de transmissão do parasito a hospedeiros vertebrados.

Contrariamente aos relatos De Amorim et al. (2010), em que não detectaram positividade ao xenodiagnóstico de animais vacinados com Leishmune[®], foi possível detectar positividade em 33,3% (8/42) de CV. A técnica foi importante na identificação de animais infectados por *Leishmania* sp., cujos resultados da qPCR foram negativos, totalizando 7 animais (7/8). A diferença observada entre os

resultados de xenodiagnóstico nesse trabalho e o desenvolvido por De Amorim et al. (2010) pode estar correlacionada à utilização de fêmeas provenientes de colônia ainda não estabelecida, ou de primeira geração (F1), cujo potencial em se infectar é reduzido, quando comparado ao de fêmeas de gerações posteriores (Guarga et al., 2000), como utilizado neste trabalho.

Embora alguns animais do grupo CV tivessem capacidade em infectar flebotomíneos, a taxa com que ela ocorreu foi significativamente inferior à observada em CL. Esse achado está de acordo com relatos observados por Saraiva et al. (2006), que identificaram que anticorpos induzidos pela vacina Leishmune[®], quando ingeridos artificialmente por flebotomíneos, reduzem a intensidade parasitária intestinal.

O xenodiagnóstico permitiu a identificação de morfotipos diferentes visualizados no intestino de *L. longipalpis* alimentadas em cães dos grupos CL e CV. Percebeu-se que o morfotipo encontrado no intestino de fêmeas alimentadas em CV foi semelhante à fase que antecede a promastigota metaciclística, a promastigota paramastigota, raramente visualizada, representando cerca de 0,1 a menos de 2% do total de formas parasitárias (Freitas et al., 2012).

Considerando que as promastigotas metaciclísticas são as formas infectivas adaptadas a infectarem os vertebrados (Pimenta et al., 2003) e que apenas essas formas, transmitidas pela picada de flebotomíneos, são aptas a induzirem infecção no hospedeiro vertebrado (Freitas et al., 2012), pôde-se sugerir que hospedeiros vertebrados, infectados via vetor, com parasitos provenientes de animais vacinados não desenvolveriam a doença. No presente estudo, ficou evidente que as fêmeas de flebotomíneos se infectaram através da alimentação em cães vacinados, mas que os parasitos por elas inoculados em outros hospedeiros não

seriam capazes de induzir a doença, pois não pertencem à forma infectante. Dessa forma, acreditou-se que os anticorpos produzidos por cães vacinados, ingeridos por *L. longipalpis*, causaram não somente a redução da carga parasitária intestinal, mas também impediram a ocorrência da metaciclogênese adequada, e o parasito não atingiu a forma promastigota metaciclíca, ou infectante.

Diante dos resultados obtidos à avaliação sorológica dos animais infectados e vacinados, pôde-se observar que foi possível a diferenciação entre animais positivos e negativos dos grupos CL e CV, utilizando ELISA-SLA. Tal fato não foi observado com uso do ELISA-FML, em que tanto animais infectados, quanto os vacinados tiveram em média, altas concentrações de anticorpos. Ficou constatado que cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentaram média de absorbância para anticorpos anti-FML maior do que a detectada em cães vacinados com vacina-FML, diferentemente de estudos realizados por Boja-Cabrera et al. (2002), cujos resultados mostraram maiores níveis de anticorpos em cães vacinados com vacina FML-Quil-A do que em cães infectados. Tal observação pode ser explicada pelo fato de que anticorpos específicos contra FML podem indicar tanto infecção natural por *L. infantum* quanto resposta protetiva induzida pela vacina contendo FML (Da Silva et al., 2001). Embora Da Silva et al. (2001) também tenham observado maior concentração de anticorpos anti-FML em cães vacinados com vacina-FML do que no grupo controle não vacinado, foi constatado, ao longo do experimento, que o nível de anticorpos anti-FML detectado no grupo de cães controle aumentou significativamente, indicando infecção natural por *L. infantum*, sendo um bom marcador de infecção (Nogueira et al., 2005).

Palatinick-de-Souza et al. (1989), testaram o uso de antígenos FML no diagnóstico da leishmaniose humana, observaram 100% de sensibilidade e 96% de especificidade, utilizando teste imunoenzimático, sendo também efetivo na determinação do prognóstico da doença. Posteriormente, Cabrera et al. (1999) demonstraram, em estudos incluindo cães infectados naturalmente com *L. infantum*, em São Gonçalo do Amaranto - Rio Grande do Norte, 100% de sensibilidade e especificidade no ensaio de ELISA-FML, sendo uma importante ferramenta diagnóstica e de controle de animais com LV em áreas endêmicas. Ainda naquele estudo, o ELISA-FML apresentou maior sensibilidade na detecção de animais infectados, porém assintomáticos, quando comparado à reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Considerando os valores de ELISA-FML obtidos para o grupo CL, foi possível identificar positividade em seis animais, cujos valores foram negativos ao ELISA-SLA, confirmando elevada sensibilidade daquele método.

Grecco et al. (2009) comparando os níveis de anticorpos anti-FML provenientes de cães vacinados com Leishmune[®] e de cães naturalmente infectados, pertencentes a áreas endêmicas de São Paulo, relataram que não foi possível diferenciar a resposta imunológica entre os grupos. O ELISA-FML não diferenciou os cães saudáveis vacinados com Leishmune[®] dos cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Porém, foi observado que cães vacinados com Leishmune[®] apresentaram 87,1% e 97,4% de testes negativos utilizando-se ELISA e IFI com antígenos *L. major* like (Biomanguinhos[®], Fiocruz, Brasil), respectivamente, utilizados em inquéritos epidemiológicos em áreas endêmicas. Observação semelhante foi realizada no presente estudo em que cães vacinados apresentaram 82% de resultados negativos ao ELISA-SLA. Dos 18% de animais vacinados positivos ao ELISA-SLA, a

metade deles teve diagnóstico confirmado pelo xenodiagnóstico ou pela qPCR. Contudo, a outra metade identificada com resultado positivo ao ELISA-SLA não teve diagnóstico confirmado por outras técnicas, podendo ser classificados como falso positivo.

Marcondes et al. (2011) identificaram que não foi possível distinguir sorologicamente os animais vacinados com Leishmune[®] dos naturalmente infectados, utilizando-se ELISA com antígeno total de promastigota de *L. infantum*. Os animais tendem a apresentar pico de produção de anticorpos identificado após seis meses do início do esquema vacinal, fazendo com que os animais vacinados, submetidos a testes sorológicos com o referido antígeno, sejam categorizados como falso positivo para LV. Achado semelhante foi encontrado em cinco animais do grupo CV, com resultado positivo ao ELISA-SLA, mas não confirmado pela qPCR. Apesar de ter sido utilizado nesse trabalho, SLA e não antígeno total de promastigota de *L. infantum*, os animais teriam resultado falso positivo.

De Amorin e colaboradores (2010) identificaram elevados níveis de anticorpos anti-FML (IgG total) em cães vacinados com Leishmune[®], sendo possível distingui-los dos cães naturalmente infectados, através da determinação de IgG total, IgG 2 e IgE. No presente trabalho, foi constatado também que animais do grupo CV apresentaram elevados níveis de anticorpos totais anti-FML, entretanto, não foi possível diferenciá-los dos de cães do grupo CL, que tiveram níveis de IgG total maiores do que os CV. Os mesmos pesquisadores, utilizando SLA, não conseguiram diferenciar animais vacinados com Leishmune[®] dos naturalmente infectados, já que o nível de IgG total médio, detectado pelo ELISA não foi estatisticamente diferente entre os grupos, diferentemente ao constatado neste trabalho, em que foi

possível estabelecer essa diferença. Tais observações permitem inferir que animais infectados apresentam maior capacidade de reagir com epítomos de variados antígenos de *Leishmania*, ao contrário de cães vacinados, que tendem a apresentar resposta mais específica à fração FML.

Assim como observado por Nogueira et al. (2005) e Santos et al. (2007), o valor da absorvância detectado no ELISA-FML de cães infectados mostrou correlação positiva com o grau de sintomatologia apresentado pelo animal, de forma que quanto maior a quantidade de sinais clínicos apresentados pelos cães, maior a concentração de anticorpos anti-FML detectada ao teste imunoenzimático.

A medula óssea representa o principal órgão hematopoético e tecido linfóide primário, sendo por isso, considerado importante órgão de armazenamento de parasitos em cães infectados com *L. infantum*. Seu grau de parasitismo pode ser associado ao estado clínico apresentado pelo animal (Trópia de Abreu et al., 2011). Nesse trabalho foi possível detectar que CS/CL apresentaram maior positividade à qPCR, bem como maior carga parasitária quando comparados aos CO/CL. Reis et al. (2006a) sugeriram que animais sintomáticos tendem a apresentar maior carga parasitária do que os assintomáticos, como observado no presente estudo.

Os resultados obtidos mostraram que a prevalência de LV em CL, determinada pela realização de qPCR (93,3%), se mostrou superior ao ELISA-SLA (74%), pois além de confirmar os resultados pelo ensaio imunoenzimático, identificou infecção por *Leishmania* sp. em seis animais, cujos resultados foram negativos ao referido teste sorológico. Martínez et al. (2011) sugeriram para a avaliação de animais assintomáticos, mas com suspeita de LV, a coleta de medula óssea para realização de qPCR, pois é o órgão permite

obter maior sensibilidade na detecção do parasito pela metodologia.

De acordo com dados disponíveis na literatura, a qPCR permite identificar animais verdadeiramente positivos para LV, independentemente da condição clínica ou sintomatologia apresentada pelo cão, diferentemente do que se observa ao emprego de outras metodologias de diagnóstico (Quaresma et al., 2009), como os testes sorológicos, por exemplo, cujos resultados apresentam correlação com o grau de sinais clínicos desenvolvido pelo cão (Reis et al., 2006a; De Queiroz et al., 2010).

O emprego da qPCR não confirmou infecção do único animal vacinado, com sinais sugestivos da doença, sendo portanto os sinais por ele apresentados decorrentes de outras enfermidades, que não a LV. O método diagnóstico revelou infecção por *Leishmania* em aproximadamente 37% (17/46) de cães vacinados, sendo 47% de CA e 52,9% de CO, reforçando mais uma vez a importância da utilização de qPCR na detecção da infecção pelo parasito, inclusive em animais vacinados. Embora a vacina promova proteção duradoura de 92% (Da Silva et al, 2001) a 95% (Borja-Cabrera et al., 2002) nos animais, não há como eliminar completamente o risco da infecção, principalmente em áreas endêmicas. Além dessa questão, não há como prever em que momento os cães contraíram o parasito, sendo que a infecção poderia ser anterior à vacinação.

O resultado obtido à qPCR para CA/CV foi maior que o obtido para CO/CV, mostrando que a vacina Leishmune[®] limita o aparecimento dos sinais clássicos da doença em animais infectados pelo parasito. Achado semelhante, mas com escopo diferente ao do presente estudo, foi observado por Santos et al. (2007), que avaliaram o efeito imunoterapêutico da vacina Leishmune[®], enriquecida com 1mg de saponina, administrada em cães

experimentalmente infectados, após seis meses da infecção. Foi constatada redução da severidade e da quantidade de sinais clínicos apresentados por esses animais, mostrando que a vacina Leishmune[®] apresenta papel importante na redução da sintomatologia clínica e, no presente estudo, inibe a manifestação da doença em animais infectados.

A literatura não relata dados em relação à utilização de qPCR em animais vacinados com Leishmune[®]. Aponta apenas a utilização cPCR com amostras de linfonodos e sangue total coletados de animais vacinados, mostrando negatividade em 100% dos animais avaliados (Nogueira et al., 2005, De Amorim et al., 2010). Contudo, alguns estudos revelam que a qPCR se mostra muito mais sensível em detectar animais verdadeiramente positivos que a reação convencional (Francino et al., 2006; Ramos et al., 2011), aumentando ainda mais a sensibilidade do teste com amostras de medula óssea (Martínez et al., 2011).

7 CONCLUSÕES

Animais vacinados com Leishmune[®] são capazes de infectar vetores *L. longipalpis*, porém em proporção reduzida, quando comparados com animais sorologicamente positivos para LV.

A vacina Leishmune[®] foi capaz de reduzir a infecção dos flebotomíneos alimentados em cães imunizados, constituindo ferramenta importante na diminuição da propagação da infecção.

Cães sintomáticos e oligossintomáticos, com anticorpos contra *Leishmania*, foram capazes de infectar flebotomíneos.

Os morfotipos encontrados à avaliação do xenodiagnóstico de cães vacinados foram diferentes dos encontrados à avaliação dos cães com anticorpos anti-*Leishmania*.

Os resultados do ELISA-FML não permitiram a diferenciação entre animais vacinados e naturalmente infectados, ao passo que foi possível fazê-lo com os resultados do ELISA-SLA.

Animais vacinados com Leishmune[®] apresentam níveis elevados de IgG total contra a fração FML.

A técnica de qPCR foi mais sensível e específica que as demais em detectar cães com infecção por *Leishmania* spp.

A carga parasitária média observada em cães vacinados, pela qPCR foi significativamente inferior à carga parasitária detectada em cães com anticorpos anti-*Leishmania*.

A vacina Leishmune[®] reduziu a carga parasitária nos animais vacinados infectados, impedindo a progressão ou a manifestação da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição Regional e Habitats das Espécies de Flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. Cap. 3, p. 207-255.
- AGUIAR, P. H. P.; SANTOS, S. O.; PINHEIRO, A. A.; et al. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. *Ver. Brás. Saúde Prod. Animal*, v.8, n.4, p. 283-294, 2007.
- ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUSA-ATTA, M. L. B. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol*, v. 106, p.151-158, 2005.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, v. 57, p. 1-87, 2004.
- AMÓRA, S. S. A.; BEVILAQUA, C. M. L.; FEIJÓ, F. M. C.; et al. Sandflies (Psychodidae: Phlebotominae) survey in an urban transmission area of visceral leishmaniasis, Northeastern Brazil. *Ver. Brás. Parasitol. Vet.*, v. 19, n. 4, p. 233-237, 2010.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonosis. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, p. 1269-1281, 2000.
- ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. C. V.; et al. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2010.
- BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 75, n. 1, p.23-34, 2005.
- BADARÓ, R.; LOURENÇO, R.; CARVALHO E. M.; et al. Estudo longitudinal soro-epidemiológico de leishmaniose visceral americana (LVA) em área endêmica de Jacobina-BA. In: *Reunião Anual sobre Doença de Chagas*, Caxambu, 1983.
- BADARÓ, R.; REED, S. G.; BARRAL, A.; et al. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in american visceral leishmaniasis. Antigen selection for detection of infection specific responses. *Am. J. Trop. Med.*, v.35, p. 72-78, 1986.
- BANETH, G. Leishmaniasis. In: Greene, C.E. *Infectious diseases of the dog and cat*.3.ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p.685-698.
- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, v.28, n.7, p.329-337, 2006.
- BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; DE ANDRADE FILHO, F. A.; et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Vet. J.*, v. 171, p 331-339, 2006.
- BATES, P. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J Parasitol.*, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.
- BENITES, A. P., et al. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho de cães. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 31, n. 1, p. 72-77, 2011.
- BORJA-CABRERA, G. P.; DA SILVA, V.O.; DA COSTA, R. T. The FML-ELISA

assay in diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 61, p. 296–301, 1999.

BORJA-CABRERA, G. P.; PONTES, N.N.C.; OLIVEIRA DA SILVA, V. et al. Long lasting protection against canine Kalaazar using the FML-QuilAsaponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine*, v.20, n.27-28, p.3277-3284, 2002.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. *Boletim Epidemiológico*, v. 6, p.6-11, 2001.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Série A. Normas e Manuais Técnicos, Brasília: Ministério da Saúde, 2006, 120p.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Situação Epidemiológica das Zoonoses de Interesse para a Saúde Pública. *Boletim Eletrônico Epidemiológico*, n. 10, p. 1-24, 2010.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Binomia. Biologia de Flebotomíneos Neotropicais. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. Cap. 4, p. 257-274.

CABRERA, G.; DA SILVA, V.; DA COSTA, R. The fucose-mannoseligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 61, n. 2, p. 296-301, 1999.

CAMINHA A.E.Q.; SOTO-BLANCO B. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral

canina na cidade de Fortaleza, CE. *Arch. Vet. Sci.*, v. 13, p. 218-222, 2008.

CANÇADO, R. D, CHIATONE, C. S. Anemia da Doença Crônica. *Ver. Brasi. Hematol. Hemoter.*, v. 24, n. 2, p. 127-136, 2002.

CARDOSO, L.; SCHALLIG, H. D. F. H.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; et al. Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 117, n. 1–2, p. 35–41, 2007.

CASTRO, I. P.; SOUSA, M. V. C.; MAGALHÃES, G. M.; et al. Perfil Hepático e Protéico em Cães com Leishmaniose Visceral. *Biosci. J.*, v. 28, n. 5, p. 799-804, 2012.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected with *L. infantum*. *Vet. Rec.*, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v. 25, n.5, p.358-368, 2003.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (CFMV). Resolução nº714, de 20 de junho de 2002. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. *Manual de Legislação*. Publicada no D.O.U. de 21-06-02. Seção 1, p.201.

COSTA, C. A.; GENARO, O.; LANA, M.; et al. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 24, p. 21-25, 1991.

- COSTA, C. H. N. Are dogs important reservoirs of visceral leishmaniasis in Brazil? *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 30, n. 155, 1997.
- COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral Leishmaniasis in Brazil. *Cad. Saúde Pública*, v. 24, n. 12, p. 2959-2963, 2008.
- COSTA-VAL, A.P.; CAVALCANTI, R.R., GONTIJO, N. F.; et al. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet. J.*, v. 174, p. 636-643, 2007.
- CUNNINGHAM, C. A. Parasitic adaptive mechanism in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol.*, v. 72, p. 132-141, 2002.
- DA SILVA, V.O., BORJA-CABRERA, G.P., CORREIA PONTES, N. N., et al. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine Kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante RN). *Vaccine*, v. 19, p. 1082-1092, 2001.
- DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the low of priority. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 117-118, 2006.
- DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, n. 48, v. 3, p. 151-156, 2006.
- DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M. S.; OTRANTO, D. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. *Paras. Vectors*. V. 4, n. 56, p. 1-4, 2011.
- DAS, A.; ALI, N. Vaccine development against *Leishmania donovani*. *Frontiers in Immunology*, v. 3, n. 99, p. 1-18, 2012.
- DAY, M. The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Paras. Vectors*, v. 4, n. 1. p. 4-48, 2011.
- DE AMORIM, I. F. G.; FREITAS, E.; ALVES, F. C.; et al. Humoral immunological profile and parasitological statuses of Leishmune® vaccinated and visceral leishmaniasis infected dogs from an endemic area. *Vet. Parasitol.*, v. 173, p. 55-63, 2010.
- DE FREITAS, E.; MELO, M. N.; COSTA-VAL, A. P.; MICHALICK, M. S. M. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Vet. Parasitol.*, v. 137, p. 159-167, 2006.
- DE FREITAS, J. C. C.; PINHEIRO, D. C. S. N.; NETO, B. E. L.; et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 45, n.1, p. 24-29, 2012.
- DE LIMA, V. M. F.; IKEDA, F. A.; ROSSI, C. N.; et al. Diminished CD4+/CD25+ cell and increased with Leishmune® in endemic area for visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 135, p.296-302, 2010.
- DE QUEIROZ, N. M. G. P.; DE ASSIS, J.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010.
- DEPLAZES, P.; SMITH, N.C.; ARNOLD, P.; et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and others parasites. *Parasite Immunol.*, v. 17 n. 9, p. 451-458, 1995.

- DE SOUZA, C. M.; SILVA, E. D.; ANO BOM, A. P. D.; et al. Evaluation of an ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnostic using recombinant proteins. *Parasite Immunol.*, v. 34, p. 1–7, 2012.
- DIAS, F.O.P; LOROSA, E. S. e REBÊLO, J.M.M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad. S. P. R. J.*, v.19, n. 5, p.1373-1380, 2003.
- DINIZ, S.A.; MELO, M. S.; BORGES, A. M.; et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet. Pathol.*, v. 42, n. 5, p. 650–658, 2005
- DUBEY, J.P.; ROSYPAL, A. C.; PIERCE, V.; et al. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 227, n. 8, p. 1266–1269, 2005.
- ELKHOURY, A. N. S. M. Vigilância e controle da leishmaniose visceral no Brasil. In: Consulta de Expertos OPS/OMS Sobre Leishmaniasis Visceral em Lãs Americas, 23 a 25 de novembro de 2005, Brasília, 2005.
- FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo. *Clin. Vet.*, v.5, n.28, p.36-44, 2000.
- FEITOSA, M. M., IKEDA, F. A.; BONELLO, F. L.; et al. Avaliação Liquórica de Cães com e sem Sintomatologia Neurológica, Naturalmente Acometidos por Leishmaniose Visceral. *Vet. Notícias*, v. 11, n. 2, p. 61-69, 2005.
- FEITOSA, M. M. Avaliação Clínica de Animais Naturalmente Infectados. In: 1º FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. *Anais...* São Paulo: Funep, 2006, p.9-14.
- FERRER, L. M. The pathology of canine leishmaniasis. In: Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution. *Proceeding...* Sevilha, Espanha, p. 21-24, 2002.
- FLEMMINGS, B. J.; PAPPAS, M. G.; KEENAN, C. M.; et al. Immune complex decomplexation of canine sera for use in a complement – fixation test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 5, p. 553-559, 1984.
- FRANCINO, O.; ALTET, L.; SA´NCHEZ-ROBERT, E., et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, v. 137, p. 214–221, 2006.
- FREITAS, V. C. O processo de interação de *Leishmania (Leishmania) chagasi* com *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* e a importância do lipofosfoliglicano (LPG). 2010. 210f. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias). - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte.
- FREITAS, V. C.; PARREIRAS, K., P.; DUARTE, A., P. M.; et al. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Its Natural Sandfly Vector *Lutzomyia longipalpis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.86, n. 4, p. 606–612, 2012.
- FOGLIA-MANZILLO, V; RESTUCCI, B; PAGANO, A., et al. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. *Vet. Rec.*, v.158, p. 690-694, 2006.
- GÁLLEGO, M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitos: lãs leishmaniosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v. 23, n. 2, p. 661-676, 2004.

- GARCIA-ALONSO, M.; BLANCO, A.; REINA, D.; SERRANO, F.J.; ALONSO, C.; NIETO, C.G. Immunopathology of the uveitis canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, v. 18, p.617-623,1996.
- GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: Canine leishmaniasis: moving towards a solution. *Proceeding...*Sevilha, Espanha, 2002. p. 7-14, 2002.
- GRECCO, F. F.; MADI, R. R.; ALLEGRETTI, S. M. Demonstração de Sorologia Negativa em Cães Vacinados com Leishmune®. *Rev. Patol. Trop.*, v. 38, n. 2, 2009.
- GRIMA, M. Z. La Leishmaniosis canina. 1a Parte. Panorâmica general de la enfermedad. *Inf. Vet. Revista oficial del consejo general de colégios veterinários de Espanhal*, p.14-18, 2005.
- GUARGA, J.L.; LUCIENTES, M. A. P.; MOLINA, R. et al. Experimental infection of *Plebothomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Trop.*, v.77, p.203-207, 2000.
- GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D. M.; SEDER, R. A. DNA vaccine: immunology, application and optimization. *An. Rev. Immunol.*, v.18, p.927-974, 2000.
- HARITH, A. E.; KOLK, A. H. J.; LAARMAN, J. J. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and Elisa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 81, p. 603-606, 1987.
- IKEDA-GARCIA, F. A.; FEITOSA, M. M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Clín. Vet.* São Paulo, v. 62, p. 32-38, 2006.
- KAYE, P. M.; AEBISCHER, T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 17, n. 10, p. 1463-1469, 2011.
- JAIN, N. C. *Essentials of Veterinary Hematology*. 2. ed. Philadelphia : Lea &Febiger, 1993. 417p.
- JOBLING, B. Anatomical drawing of biting flies. London: British Museum (Natural History) and the Wellcome Trust Publisher; 1987, 119p.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. San Diego: Academic Press, 1997. 932p.
- KEMP, K.; THEANDER, T. G.; HVIID, L.; et al. Interferon and tumour necrosis factor producing cells in humans who are immune to cutaneous leishmaniasis. *Scan. J. Immunol.*, v. 49, p.655-659, 1999.
- KEYE, P.M.; AEBISCHER, T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 17, p. 1462-1470, 2011.
- KIMSEY, P. B.; THEODOS, C. M.; MITCHEN, T. K.; et al. An avirulent lipophosphoglycan- deficient *Leishmania major* clone induces CD4+ T cells which protect susceptible BALB/c mice against infection with virulent *L. major*. *Infect. Immun.*, v. 61, p.5205-5213, 1993.
- LABAT, É.; CARREIRA, J.T; MATSUKUMA, B. H.; et al. Qualidade espermática de sêmen de cães naturalmente infectados por *Leishmaniasp.* *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 62, n. 3, p.609-614, 2010.
- LAINSON, R; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors.

The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London: Academic Press; 1987. p.1-121.

LIMA, M. F.; PEIRO, J. R. VASCONCELOS, R. O. IL-6 and TNF- α production during active canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 115, p. 189-193, 2007.

LIMA, V. M. F. et al. Diminished CD4+/CD25+ T cell and increased IFN- γ levels occur in dogs vaccinated with Leishmunel in an endemic area for visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.135, p. 296–302, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, n.1, p.265- 275, 1951.

LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações Patológicas em Animais Naturalmente Infectados. In: 1º FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. *Anais...* São Paulo: Funep, 2006, p. 15-22.

MACHADO, J. G.; TRONCARELLI, M. Z.; VELA, J. R.; et al. Padronização do Ensaio Imunoenzimático para Leishmaniose Visceral Canina utilizando *Leishmania major* como antígeno. In: 1º FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. *Anais...* São Paulo: Funep, 2006, p.46-47.

MANCIANTI, F., POLI, A. e BIONDA, A. Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parasitol.*, v.31, n..2-3, p.213-230, 1989.

MARCONDES, M.; IKEDA, F. A.; VIEIRA, R. F. C.; et al. Temporal IgG subclasses response in dogs following vaccination against *Leishmania* with Leishmune®. *Vet. Parasitol.*, v. 181, p. 153-159, 2011.

MARTÍNEZ, V.; QUILEZ, J.; SANCHEZ, A. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Paras. Vectors*, v. 4, n. 57, p. 1-5, 2011.

MASUCCI, M. et al. Canine leishmaniasis in the newborn puppy. *Vet. Res. Commun.*, v. 27, n. 1, p.771–774, 2003.

MATTOS JR., D. G.; PINHEIRO, J. M.; MENEZES, R.C.; COSTA, D. A. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.1, p.119-122, 2004.

MAURICIO, I. L.; GAUNT, M. W.; STODARD, J. R.; MILES, M. A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitol.*, v. 122, p. 393-403, 2001.

MENDES, C. O.; DE SOUZA; E. P.; BORJA-CABRERA, G. P.; et al. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniosis. *Vaccine*, v.21, n. 19–20, p. 2589–2597, 2003.

MENZ, I. Leishmune® - Desenvolvimento e resultados atuais (2005). In: 1º FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. *Anais...* São Paulo: Funep, 2006, p. 37-45.

MICHALICK, M.S.M; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. (Ed) Parasitologia humana. 11ª ed., Ed. Atheneu, São Paulo, 2005. p. 56-72.

MICHALSKY, E. M.; ROCHA, M. F.; LIMA, A. C. V. M. R.; et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand

- flies. *Vet. Parasitol.*, v. 147, n.1-2, p. 67-76, 2007.
- MIRALLES, G. D.; STOECKLE, M. Y.; MCDERMOTT, D. F.; et al. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun.*, v. 62, n. 3, p. 1058–1063, 1994.
- MISSAWA, N. A.; VELOSO, M. A. E.; MACIEL, G. B. M. L.; et al. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 44, n. 1, p. 76-78, 2011.
- MITCHELL GF, HANDMAN E, SPITHILL TW. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in mice using nonpathogenic cloned promastigotes of *Leishmania major* and importance of route of injection. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, v. 62, 145–153, 1984.
- MODI, G. B. e TESH, R.B.A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J. Med. Entomol.*, v.5, n.20, 1983.
- MOHAMMED, A. R.; WRIGHT, E. P.; ABDEL RAHMAN, A. M.; et al. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of Elisa - immunofluorescence and indirect haemagglutination. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 80, p. 271-274, 1986.
- MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 88, n. 4, p. 491-493, 1994.
- MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; GARCIA, J. F.; et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet. Parasitol.*, v. 145, n. 2-3, p. 245-252, 2007.
- MORENO, J. e ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.*, v.18, n.9, p.399-405, 2002.
- MOUGNEAU, E., BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol. Rev.*, vol. 240, p. 286- 296, 2011.
- NAGILL, R.; KAUR, S. Canine candidates for leishmaniasis: A Review. *Int. Immunopharmacol.*, v. 11, p. 1464-1488, 2011.
- NETO, R. G. T.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; et al. Relationship of *Leishmania*-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v 169, n. 3-4, p. 248-257, 2010.
- NIETO, C.G.; GARCÍA-ALONSO, M.; REQUENA, J. M.; et al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 67, n. 2, p.117–130, 1999.
- NOGUEIRA, F. S.; MOREIRA, M. A. B.; BORJA-CABRERA, G. P.; et al. Leishmune® vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis. Absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*, v. 23, p. 4805–4810, 2005.
- OLIVEIRA, V. V. G.; ALVES, L. C.; DA SILVA JUNIOR, V. A. Patologias genitais associadas à leishmaniose visceral canina.

Ciênc. Rural, v. 42, n. 9, p. 1614-1620, 2012.

PALATNIK, C. B.; BOROJEVIC, R.; PREVIATO, J. O. et al. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigota internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. *Infect. Immun.*, v.57, n.3, p.754-763, 1989.

PALATNIK-DE-SOUZA, C. B.; GOMES, E. M.; PARAGUAI-DE-SOUZA, E.; et al. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-manose-ligand as an AID in diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 89, p. 390-393, 1995.

PALATNIK-DE-SOUZA, C. B.; SILVA-ANTUNES, I.; MORGADO ADE, A.; et al. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune[®] in Brazilian endemic areas. *Vaccine*, v. 27, p. 3505-3512, 2009.

PALIS, P. H.; ORNELAS, S. V.; GASPAR, D. V.; et al. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Saúde e Produção. Animal*, v.8, n.4, p. 283-294, 2007.

PALUDO, G. R, AQUINO, L. C. LOPES, B. C. C., et al. Laboratory Findings in Canine Visceral Leishmaniasis In Brasília, Brazil. *Vet. Clin. Pathol.*, v. 36, p. 382-398, 2007.

PAPPAS, M. G.; CANNON, L. T.; HOCKMEYER, W. T.; et al. Evaluation of complement fixation procedures for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v 79, p.147-51, 1985.

PIMENTA, P. F. P.; MODI, G. B.; PEREIRA, S. T.; et al. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, v. 115, n. 4, p. 359-369, 2000.

PIMENTA, P. F. P.; et al. Iteração vetor-hospedeiro: interação *Leishmania*-hospedeiro invertebrado. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. Cap. 5, p. 275-289.

QUARESMA, P. F. *Diagnóstico Molecular da Leishmaniose Visceral Canina e Quantificação da Carga Parasitária Através da Reação em Cadeia da Polimerase*. 2007. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte.

QUARESMA, P. F.; MURTA S. M.; FERREIRA EDE C., et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop.*, v.111, n. 3, p. 289-294, 2009.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*, v. 122, p. 253-261, 2001.

RAMOS, R. A. N. ; RAMOS, C. A. N.; JUSI, M. M. G., et al. Polymerase chain reaction and real-time PCR for diagnosing of *Leishmania infantum chagasi* in dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 21, n. 3, p. 192-195, 2012

REIS, A. B.; COURA-VITAL, W. Antígeno Solúvel Aplicado ao Diagnóstico Sorológico da Leishmaniose Visceral Canina Através da Reação

Imunoenzimática (ELISA). Brasil patente PI 0605889-2A, 2006 Dez 15, 2007 Out 16.

REIS, A. B, MARTINS-FILHO, O. A, TEIXEIRA-CARVALHO, A, et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, v. 81, p. 68-75, 2006a.

REIS, A. B, TEIXEIRA-CARVALHO, A, GIUNCHETTI, R. C, et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 146, n. 2, p. 303-311, 2006b.

RIVIER D, SHAH R, BOVAY P, MAUEL J. Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 152, p. 35-46, 1993

RODRÍGUEZ, O. L.; CABRERA, M.; RODRÍGUEZ, V.; et al. Estudio preliminar de citocinas un suero de perros con leishmaniasis visceral en una zona endémica venezolana. *Rev. Fac. Cienc. Vet.*, v. 51, n. 1, p. 43-50, 2010.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, v. 124, n. 5, p. 495-507, 2002.

SALOMAO, R.; CASTELLO, F. A.; DE MEDEIROS, I. M.; SICOLO, M. A. Plasma levels of tumor necrosis factor in patients with visceral leishmaniasis (Kala-azar). Association with activity of the disease and clinical remission following

antimonial therapy. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v. 38, p.113-118, 1996.

SANCHEZ-ROBERT, E., ALTET, L.; ALBEROLA, J.; et al. Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC um *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 125, p. 168-177, 2008.

SANTOS, F. N.; BORJA-CABRERA, G. P.; MIYASHIRO, L. M.; et al. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune[®] vaccine. *Vaccine*, v. 25, p. 6176-6190, 2007.

SARAIVA, E. M.; BARBOSA A. F.; SANTOS, F.N., et al. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. *Vaccine*, v. 24, n.13, p. 2423-2431, 2006.

SCHEFE, J. H.; LEHMANN K. E.; BUSCHMANN, I. V., et al. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s C_T difference” formula. *J. Mol. Med.*, v. 84, p. 901-910, 2006.

SCHIJNS, V.; HORZINEK, M. Cytokines in Veterinary Medicine. *Aust. Vet. J.*, v. 77, p.194, 1999.

SEN, G.; MUKHOPADHYAY, R.; GHOSAL, J.; BISWAS, T. Oxidative damage of erythrocytes: a possible mechanism for premature hemolysis in experimental visceral leishmaniasis in hamsters. *Ann. Hematol.*, v. 80, n. 1, p. 32-37, 2001.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas*. Vol. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.

- SILVA, S.M., RABELO, P.F.B., GONTIJO, N.F., et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.174, p. 150-154, 2010.
- SOARES, M. R. A.; MENDONÇA, I. L.; BONFIM, J. M.; et al. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Trop.*, v. 117, n. 1, p. 6-9, 2011.
- SOLANO-GALLEGO, L, KOUTINAS, A, MIRÓ, G, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v. 165, p. 1-18, 2009.
- SOLANO-GALLEGO, L.; ROSSI, L.; SCROCCARO, A. M.; et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniasis. *Paras. Vectors*, v. 5, n. 98, p. 1-6, 2012.
- SOLCÀ, M. S.; GUEDES, C. E. S.; NASCIMENTO, E. G.; et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.*, v. 184, p. 133– 140, 2012.
- STOCKHAM, S. L, SCOTT, M. A. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 2. ed. Iowa: Blakwell Publishing, 2008. 729p.
- TAFURI, W. L; DE OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N. et al. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.96, n.3, p.203-212, 2001.
- TAFURI, W. L.; et al. Diagnóstico imunohistoquímico para leishmaniose visceral canina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 23, 2003, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, 2003.
- TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J. Immunol. Methods*, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.
- TASCA, K. I.; BUZETTI, W. A. S.; TENÓRIO, M. S. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. *Ver. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 18, n. 1, p. 27-33, 2009.
- TRAVI, B.L.; TABARES, C.J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 64 p. 19-24, 2001.
- TRAVI, B. L.; OSORIO, E. Y.; SILDARRIAGA, O. A.; et al. Clinical, Parasitologic, and Immunologic Evolution in Dogs Experimentally Infected with Sand Fly-Derived *Leishmania chagasi* Promastigotes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 81, n. 6, p. 994-1008, 2009.
- TRÓPIA DE ABREU, R.; CARVALHO, M. G.; CARNEIRO, C. M; et al. Influence of Clinical Status and Parasite Load on Erythropoiesis and Leucopoiesis in Dogs Naturally Infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Plos One*, v. 6, n. 5, p. 1-9, 2011.
- TROTZ-WILLIAMS, L.; GRADONI, L. Disease risks for the travelling pet: Leishmaniasis. *In Practice*, v. 25, p. 190-197, 2003.

VOLLER, A., BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): a guide with abstracts of microplate applications. Guernsey: Dynatech Europe, 1979. 124p.
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the leishmaniasis. *W. H. O. Tech. Rep. Ser.*, v..793, p.106, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. *W. H. O. Tech. Rep. Ser.*,v.949, 186 p., 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) a. TDR diseases/Diseases current portfolio. Disponível em <http://www.who.int/tdr/publications/pdf/pr13/leis.pdf/pr13 / leish.pdf>> Acesso em 08de agosto de 2011.

YIN, D.; NORRIS, E.; LANZARO, G. C. Sibling species in the *Lutzomyia longipalpis* complex differ in levels of mRNA expression for the salivary peptide, maxadilan. *Insect Mol. Biol.*, v. 9, n. 3, p. 309-314, 2000.

ANEXO A - DCF

ESTUDO No.	IDENTIFICAÇÃO DOS CÃES	DCF - A
		____ DE ____

PROPRIETÁRIO: _____

ENDEREÇO: _____

NOME DO ANIMAL: _____

RAÇA: _____ SEXO: _____ IDADE: _____ PESO: _____

VACINAÇÃO CONTRA LEISHMANIOSE: SIM NÃO

(SE A RESPOSTA ACIMA FOR SIM, PREENCHER O RESTANTE DO FORMULÁRIO ABAIXO)

VACINAÇÃO COM LEISHMUNE: SIM:

DATA: _____ PARTIDA: _____ DATA VENCIMENTO: _____

DATA: _____ PARTIDA: _____ DATA VENCIMENTO: _____

DATA: _____ PARTIDA: _____ DATA VENCIMENTO: _____

NOME: _____

MÉDICO VETERINÁRIO

(POR EXTENSO)

ASSINATURA: _____

INCLUSÃO NO ESTUDO? : SIM

NÃO

GRUPO ?

DATA: _____

ESTUDO No.	EXAME CLÍNICO	DCF – B
		DE _____

Animal		Data / /		
Estado geral:				
Frequência cardíaca	Frequência respiratória	Tempo de preenchimento capilar	Mucosa oral	Mucosas oculares
Linfonodos submandibulares	Linfonodos cervicais superficiais	Linfonodos popliteos	Temperatura retal	Pulso
Exame do tórax				
Exame do abdome				
Observações				

Animal		Data / /		
Estado geral:				
Frequência cardíaca	Frequência respiratória	Tempo de preenchimento capilar	Mucosa oral	Mucosas oculares
Linfonodos submandibulares	Linfonodos cervicais superficiais	Linfonodos popliteos	Temperatura retal	Pulso
Exame do tórax				
Exame do abdome				
Observações				

Explicação das correções

Assinatura: _____ Data: _____

Responsável pelo teste

Assinatura: _____ Data: _____

Investigador

ESTUDO No.	XENODIAGNÓSTICO	DCF – C
		____ DE ____

Animal.	Data	Sedação (Medicamento, dose, via)	HORA INÍCIO	HORA TÉRMINO	IDENTIFICAÇÃO FLEBOCONTAINER

S = sim N = Não

Explicação das correções

Assinatura: _____ Data: _____

Responsável pelo teste

Assinatura: _____ Data: _____

Investigador

ESTUDO No.	RESULTADOS XENODIAGNÓSTICO	DCF – E
		DE _____

Animal _____ Data __/__/____	Xenodiagnóstico Total de insetos _____				
	Insetos mortos _____	Insetos vivos _____			
	Machos _____	Machos _____			
		Não alimentadas _____			
	Fêmeas _____	Fêmeas _____	Alimentadas _____	Não infectadas _____	Infectadas _____
+					
++					
+++					
Animal _____ Data __/__/____	Xenodiagnóstico Total de insetos _____				
	Insetos mortos _____	Insetos vivos _____			
	Machos _____	Machos _____			
		Não alimentadas _____			
	Fêmeas _____	Fêmeas _____	Alimentadas _____	Não infectadas _____	Infectadas _____
+					
++					
+++					

Explicação das correções

Assinatura: _____ Data: _____

Responsável pelo teste

Assinatura: _____ Data: _____

Investigador

ESTUDO No.	RESULTADOS ELISA-FML	DCF – H
		____ DE ____

Placa _____

Data _____

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

Resultado impresso

Explicação das correções

Assinatura: _____ Data: _____

Responsável pelo teste

Assinatura: _____ Data: _____

Investigador

ANEXO B - Intervalos de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos de cães adultos

Teste/unidade	Valores de referência
Volume Globular (%)	37-55
Hemoglobina (g/dL)	12-18
Eritrócitos (x 10 ⁶ céls/μL)	5,5-8,5
VCM (fL)	60-77
CHCM (g/dL)	32-36
HCM (g/dL)	19,5-24,5
Leucócitos totais (céls/μL)	6.000-17.000
Mielócitos (céls/μL)	0
Metamielócitos (céls/μL)	0
Neutrófilos Bastonetes (céls/μL)	0-300
Neutrófilos Segmentados (céls/μL)	3.000-11.500
Eosinófilos (céls/μL)	100-1.250
Basófilos (céls/μL)	Raros
Linfócitos (céls/μL)	1.000-4.800
Monócitos (céls/μL)	150-1.350
Plaquetas (x 10 ³ /μl)	175-500

Quadro 1- Intervalos de referência para parâmetros hematológicos de cães adultos (Jain, 1993).

Teste/unidade	Intervalo de referência
Uréia (mg/dL)	20-56
Creatinina (mg/dL)	0,5-1,5
AST (U/L)	0-110
ALT (U/L)	0-110
Proteínas totais (g/dL)	5,4-7,5
Albumina (g/dL)	2,3-3,1
Globulina (g/dL)	2,7-4,4
Relação A/G	0,6-1,1

Quadro 2- Intervalos de referência para parâmetros bioquímicos de cães adultos (Kaneko, 1997).

ANEXO C - Soluções utilizadas - ELISA

1- Soluções utilizadas no teste sorológico ELISA-SLA

Tampão Salina Fosfatada (PBS) concentrado 10 X

Inicialmente, pesar os seguintes reagentes:

NaCl 21,25 g

Na₂HPO₄ 3,30 g

NaH₂PO₄ . H₂O 0,39 g

Dissolver os reagentes pesados em água destilada qsp 2500 ml.

Tampão Carbonato/Bicarbonato

Na₂CO₃ (Reagem A 010186) 1,59 g

NaHCO₃ (Reagem A 019952) 2,93 g

Dissolver os reagentes pesados em água destilada qsp 1000 ml. Esta solução permanece viável a 4°C por 15 dias.

Solução de Bloqueio

Tampão Salina Fosfatada 1000 ml

Caseína(Sigma C.0376) 20 g

Aquecer o Tampão a aproximadamente 90°C, adicionar a Caseína lentamente, agitando bastante com um bastão. Filtrar e conservar em -20°C.

Tampão de Incubação

Tampão Salina Fosfatada 1000 ml

Tween 20(Reagem A.010185) 0,5 ml

Caseína 2,5g

Aquecer o Tampão a aproximadamente 90°C adicionar a caseína lentamente, agitando bastante com um bastão. Filtrar, adicionar o Tween e conservar em -20°C.

Tampão do Substrato

Na₂HPO₄ 7,19 g

Ácido Cítrico(Merck 244) 5,19 g

Água destilada qsp 1000 ml

Dissolver os elementos pesados na água destilada e conservar a 4°C.

Solução do Substrato

OPD(Sigma P.2903) 4µg

H₂O₂ 4µl

Tampão do Substrato 10 ml

Preparar no momento do uso.

Ácido Sulfúrico 4N

H₂SO₄ concentrado(Merck) 480 ml

H₂O qsp 1000 ml

Solução de Lavagem

NaCl	9 g
Tween 20 qsp	1000 ml

2- Soluções utilizadas no teste sorológico ELISA-FML

Tampão Carbonato Bicarbonato pH 9,6

Solução A

NaHCO ₃ 0,06M	5,0406g/L
Água milliqui q.s.p.	1 litro.

Solução B

Na ₂ CO ₃ 0,06M	6,3594g/L
Água milliqui q.s.p.	1 litro.

Usar uma parte da solução B + até quatro partes da solução A. Ajustar o pH para 9,6 da seguinte forma: se estiver maior que 9,6 adicionar Solução A, se estiver menor que 9,6 adicionar Solução B.

Tampão Fosfato Salina (PBS - 0,018M)

NaCl	8,18g
Na ₂ HPO ₄	1,05g
ou Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	2,16g
ou Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	2,651g
ou Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1,318g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,357g
ou NaH ₂ PO ₄	0,310g
Água milliqui q.s.p.	1000mL

Tampão Fosfato Salina - Tween-leite em pó (PBS*)

Tween 20 a 0,05% (v/v), 1% (p/v) de leite em pó desnatado em 100mL de PBS

Tampão OPD pH 4.9-5.2

Solução A

Na ₂ HPO ₄	11,9g
H ₂ O milliqui q.s.p.	1.000mL

Solução B

C ₆ H ₈ O ₇ . H ₂ O(Ácido Cítrico)	7g
H ₂ O milliqui q.s.p.	1.000mL

Solução do Substrato

Orto-phenyldamidina (Sigma® Aldrich, EUA)	2,4mg
H ₂ O ₂ (30V)	2,4µL
Tampão OPD	6mL
Preparar no momento do uso	

Ácido Sulfúrico 1N

Usar 2,52mL do ácido (H₂SO₄), 96% para 50mL de água milliqui. Colocar primeiramente a água e depois o ácido.

ANEXO D - Soluções utilizadas – qPCR

Tampão de lise

Tris-HCL 1M pH 8,0	1,0 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	2,0 mL
NaCl 1M	10 mL
SDS 10%	10 mL
Água miliqui q.s.p.	100 mL

Armazenar em frasco devidamente identificado e autoclavar. Homogeneizar utilizando agitador magnético e conservar entre 2°C e 8°C. Estável por seis meses.

Solução de Proteinase K 10mg/mL

Proteinase K	1 frasco
Água miliqui	10 mL

Adicionar a água ao frasco de proteinase K e homogeneizar. Aliquotar em frascos tipo *ependorf* âmbar e armazenar entre -5°C e -25°C. Estável por um ano.

Solução clorofórmio:álcool isoamílico 24:1

Clorofórmio	24 mL
Álcool isoamílico	1 mL

Armazenar em frasco âmbar e homogeneizar por inversão. Armazenar entre 2°C e 8°C. Estável por um ano.

Solução de acetato de amônio 3M

Acetato de amônio	23,12g
Água miliqui q.s.p.	100 mL

Homogeneizar utilizando agitador magnético. Filtrar com papel filtro e armazenar em frasco entre 2°C e 8°C. Não autoclavar. Estável por um ano.

Solução de etanol 70%

Álcool etílico absoluto	700 mL
Água miliqui q.s.p.	1000 mL

Armazenar em frasco à temperatura ambiente. Homogeneizar por inversão. Estável por um ano.

Tampão eluição

Tris-HCL 1M pH 8,0	1,0 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	200 mL
Água miliqui q.s.p.	100 mL

Armazenar em frasco devidamente identificado e autoclavar. Homogeneizar por inversão. Conservar entre 2°C e 8°C. Estável por seis meses

ANEXO E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa: “Avaliação clínico-laboratorial e do xenodiagnóstico em cães com anticorpos anti-Leishmania e de cães vacinados com Leishmune[®], provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral canina”.

Você foi selecionado, pois seu cão foi vacinado com Leishmune no esquema vacinal correto e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em trazer o seu animal no horário marcado para a colheita de material.

Os riscos relacionados com a participação do animal serão discreta dor nos locais de colheita de material, após o procedimento.

Os benefícios relacionados com a participação do animal são:

- Ajudar a elucidar dúvidas quanto ao perfil laboratorial e capacidade infectante ao vetor do animal vacinado;
- Recebimento gratuito de 1 (um) reforço anual das vacinas Leishmune[®], Linha Vanguard (HTLP ou Plus), Defensor (anti-rábica) e Bronchiguard (Traqueobronquite), sendo esta última concedida 1 (um) reforço extra caso seja primovacinação. Todas as vacinas serão entregues ao veterinário responsável pelo animal.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação.

Os dados informados serão o nome do animal, idade e os dados gerados através da pesquisa.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do CEP, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação

Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho
Escola de Veterinária da UFMG – (31) 3409-2247
Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. Concordo na utilização das fotos do animal na apresentação da pesquisa e possíveis publicações.

Sujeito da pesquisa
Escola de Veterinária – UFMG / Belo Horizonte - MG