

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Avaliação da infecciosidade em cães vacinados com Leish-Tec[®]
(Hertape Saúde Animal S/A) para *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:
Psychodidae, Phlebotominae).**

por

Shara Regina da Silva

Belo Horizonte

2015

Shara Regina da Silva

**Avaliação da infecciosidade em cães vacinados com Leish-Tec[®]
(Hertape Saúde Animal S/A) para *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:
Psychodidae, Phlebotominae).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciências, na área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dr. Edelberto Santos Dias
Coorientação: Dr. George Luiz Lins
Machado Coelho

Belo Horizonte

2015

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S586a Silva, Shara Regina da.
2015

Avaliação da infecciosidade em cães vacinados com Leish-Tec[®] (Hertape Saúde Animal S/A) para *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) / Shara Regina da Silva. – Belo Horizonte, 2015.

XVI, 69 f.: il.; 210 x 297mm.
Bibliografia: f.: 66-74

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose Visceral/imunologia 2. *Leishmania donovani*/parasitologia 3. Vacinas contra Leishmaniose/uso terapêutico I. Título. II. Dias, Edelberto Santos (Orientação). III. Coelho, George Luiz Lins Machado (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Shara Regina da Silva

**Avaliação da infecciosidade em cães vacinados com Leish-Tec[®]
(Hertape Saúde Animal S/A) para *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:
Psychodidae, Phlebotominae).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciências, na área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Edelberto Santos Dias (CPqRR) Presidente.

Prof. Dr^a Maria Norma Melo (UFMG) Titular

Prof. Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta (CPqRR) Titular

Prof. Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo (CPqRR) Titular

Prof. Dr. Ricardo Andrade Barata (UFVJM) Titular

Prof. Dr. Daniel Avelar (CPqRR) Suplente

Tese defendida e aprovada em 28/08/2015

***“O primeiro gole das ciências naturais
nos torna ateus, mas, no fundo do copo,
espera-nos Deus.”***

(Werner Heisenberg – prêmio Nobel de Física)

Esse trabalho é dedicado a

VOCÊ...

**Que se empenhou, de coração, com toda força, e de diversas formas, para que ele
pudesse ser realizado e finalizado.**

Agradecimentos

Agradeço às instituições financiadoras que viabilizaram a execução desse projeto:

Laboratório Hertape Saúde Animal S/A

Fiocruz - Centro de Pesquisas René Rachou

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Agradecimentos

À Deus, pela força do renascimento de cada dia, pela energia do vida.

Aos meus pais, Maria Alves e Antonio Gonçalves da Silva, pelo amor incondicional, por terem me proporcionado todas as oportunidades de que precisei para chegar até aqui. À minha mãe, agradecimento especial pelo empenho diário na educação e formação do meu filho.

Ao meu filho Theo Gonçalves Alvarenga, por preencher a minha vida com felicidade e amor infinitos, por me permitir a experiência de ser mãe e por me tornar uma pessoa melhor (inclusive, que dorme menos, no sentido literal ou não).

Ao Vitor Moreira Alvarenga e família pelo apoio, compreensão, ensinamentos e, sobretudo, pelo exemplo que me encanta.

Ao meu orientador Dr. Edelberto Santos Dias, agradeço por todas as oportunidades que tive desde que ingressei no laboratório, em 2007. Por todos os ensinamentos, por todos os projetos que pude colaborar e aprender, por todos os cursos que pude participar, pela oportunidade de trabalhar na colônia de flebotomíneos. Agradeço especialmente pela compreensão que teve nos momentos mais difíceis, nunca vou me esquecer e serei sempre grata. Pelo empenho nessa reta final. E, sobretudo, agradeço por poder estar no ambiente agradável e feliz que é o LALEI, onde os risos (às vezes escandalosos) eram bem vindos.

Ao meu co-orientador Dr. George Luiz Lins Machado Coelho, agradeço pela oportunidade de participar do fase III da LeishTec[®], pelos ensinamentos, pelas infinitas análises estatísticas. Pela disponibilidade e mente aberta.

À Dra. Consuelo Latorre Forte Dias pela revisão, tradução e análise crítica do artigo do mestrado e dos “pré”-artigos do doutorado. Sua colaboração sempre agrega muito.

À Dra. Ana Paula Fernandes pela enorme contribuição na redação final do artigo de doutorado, pelas inúmeras horas de trabalho via skype, pela incrível didática que tornou o artigo muito melhor.

Ao Dr. João Carlos França Silva, agradeço por todos as colaborações e ensinamentos desde o mestrado, pelo apoio em trabalho de campo e pela presença bem humorada e sempre feliz.

Aos colegas do LALEI, Érika Michalsky, Fabiana Lara, Josiane Lopes, Maiara Alves, Lisiane Gomes, Luciana Moura e todos os demais: muito obrigada pelo convívio prazeroso, pelo apoio, pelas colaborações em experimentos e trabalho de campo e pela amizade e carinho. Pelas conversas agradáveis que tornaram os dias mais leves. Agradecimento especial à equipe do xenodiagnóstico, Érika e Josie, que fizeram do experimento um sucesso, mesmo diante dos desafios. Agradecimento especial à Fabiana Lara, que nessa reta final “adotou” meu trabalho como se fosse o seu.

Às minhas alunas de iniciação científica, Pollyanne Gomes, Ana Clara Lamounier e Luíza Ramos, agradeço pela oportunidade de orientar e de aprender com vocês. Foi uma experiência maravilhosa.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou pela oportunidade de fazer parte dessa instituição. À biblioteca do CPqRR por prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-

científica em saúde custeada com recursos públicos federais, sendo rol de referências dessa tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

Aos moradores de Porteirinha, que sempre me receberam carinhosamente de portas abertas, e mesmo não compreendendo a complexidade da pesquisa, confiaram seus animais às nossas mãos.

Aos agentes de saúde de Porteirinha, em especial meu parceiro de campo Paulo César: obrigada pelo carinho, paciência e cuidado que teve na contenção de todos os cães. Seria impossível tantas coletas sem o seu talento.

Ao meu querido gato Branco, meu fiel companheiro de redação. Sua presença silenciosa me bastou.

Aos meus colegas da ONG Meu Amigo Cão – MAC, sediada em Ipatinga/MG, agradeço por me ensinar diariamente a que é, para mim, a maior de todas as ciências; a ciência do amor e do respeito à vida.

Aos cães participantes desse trabalho, minha infinita gratidão.

Resumo

O presente trabalho avaliou a transmissibilidade de *Leishmania* spp. para *Lutzomyia longipalpis* em 136 cães nativos e beagles-sentinelas, vacinados ou não (placebo) com Leish-Tec[®] (vacina anti-leishmaniose visceral canina), domiciliados em Porteirinha, município endêmico para leishmaniose visceral, em Minas Gerais. Esses animais foram selecionados a partir da amostra total de cães que compõem o ensaio clínico de fase III que determinou a eficácia da vacina Leish-Tec[®], conforme diretrizes estabelecidas pelo Ministério da Saúde do Brasil. Além da técnica de xenodiagnóstico, esses cães também foram submetidos aos testes diagnósticos ELISA, RIFI, teste rápido Kalazar DetectTM e exames de detecção do parasito. Uma tendência de redução da infectividade (p-valor 0,052) foi observada no grupo de cães vacinados com Leish-Tec[®] que apresentaram resposta sorológica positiva ao antígeno vacinal A2. Os testes RIFI, Kalazar DetectTM e xenodiagnóstico apresentaram maior percentual de positividade entre os cães sintomáticos da amostra (p<0,05), quando comparados aos cães assintomáticos, na análise global. Na análise estratificada e, para o grupo de cães que recebeu vacina, as diferenças se mantiveram para a RIFI e o teste rápido, mas não para o xenodiagnóstico; já para os cães que receberam placebo, as diferenças entre grupos clínicos se mantiveram para o xenodiagnóstico e teste rápido, mas não para a RIFI. Nossos resultados sugerem que a Leish-Tec[®] possui potencial de redução da infectividade em cães vacinados e desafiados em área endêmica e que a vacinação com Leish-Tec[®] pode contribuir para a redução da transmissão da leishmaniose visceral canina, desde que utilizada como medida protetiva individual e em conjunto com as demais estratégias, individuais e coletivas, de prevenção e controle da doença. Com relação à diferença de desempenho dos testes diagnósticos entre grupos clínicos, nossos resultados apontam para a necessidade de desenvolvimento de testes mais eficazes no diagnóstico da infecção assintomática por *Leishmania* e demonstra que essas diferenças interferem nos resultados e devem ser consideradas na avaliação de ensaios clínicos.

Abstract

This study evaluated the transmission of *Leishmania* spp. to *Lutzomyia longipalpis* in 136 native and beagles sentinel dogs, vaccinated or not (placebo) with Leish-Tec[®] (canine visceral anti-leishmaniasis vaccine), domiciled in Porteirinha, visceral leishmaniasis endemic county in Minas Gerais, Brazil. These animals were selected from the total sample of dogs that make up the phase III clinical trial that determined the efficacy of Leish-Tec[®] vaccine, according to guidelines established by Brazilian Ministry of Health. Besides the xenodiagnosis technique, these dogs were also subjected to the serological tests ELISA, IFAT, rapid test Kalazar Detect[™] and parasite detection. A tendency of reduction of infectivity (p-value 0.052) was observed in the group of dogs vaccinated with Leish-Tec[®] that presented positive serological response to the vaccine antigen A2. IFAT, Kalazar Detect[™] and xenodiagnosis showed a higher percentage of positivity among symptomatic dogs (p <0.05) compared to asymptomatic dogs. In stratified analysis, and for the vaccine dogs group, differences remained for the IFAT and the rapid test, but not for xenodiagnosis; already for placebo dogs group, the differences between clinical groups remained to xenodiagnosis and rapid test, but not for the IFAT. Our results suggest that the Leish-Tec[®] has the potential to reduce the infectivity of vaccinated and challenged dogs in endemic areas and could contribute to the reduction of transmission of canine visceral leishmaniasis, since used as an individual protective measure and together with other strategies, individual and collective, to prevent and control the disease. Regarding the performance difference of diagnostic tests between clinical groups, our results point to the need for development of more effective tests in the diagnosis of asymptomatic *Leishmania* infection and shows that these differences affect the results and should be considered in evaluating clinical trials.

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Resumo dos trabalhos científicos indexados no PUBMED, que realizaram a técnica do xenodiagnóstico em cães. | 29 |
| Figura 2: Localização geográfica de Porteirinha, MG. | 38 |
| Figura 3: Frequência dos sinais clínicos sugestivos da LVC, no grupo de cães sintomáticos, Porteirinha/MG, 2010. | 49 |
| Figura 4: Percentual de positividade dos testes diagnósticos, estratificado por classificação clínica, Porteirinha/MG, 2010. | 50 |
| Figura 5: Percentual de positividade dos testes diagnósticos, no grupo placebo, estratificado por classificação clínica, Porteirinha/MG, 2010. | 51 |
| Figura 6: Percentual de positividade dos testes diagnósticos, no grupo vacinado, estratificado por classificação clínica, Porteirinha/MG, 2010. | 51 |
| Figura 7: Boxplot da comparação da distribuição de resultados positivos por cão diagnosticado, entre os grupos clínicos sintomático e assintomático, em cães domiciliados em Porteirinha/MG, 2010. | 52 |
| Figura 8: Boxplot da comparação da distribuição de resultados positivos por cão diagnosticado, entre os grupos clínicos sintomático e assintomático, (A) placebo e (B) vacinado, em cães domiciliados em Porteirinha/MG, 2010. | 53 |
| Figura 9: Visualização dos resultados da reação de PCR kDNA, em amostras de flebotomíneos (xenodiagnóstico) – gel de agarose 2%. | 55 |
| Figura 10: Frequência dos cães que soroconverteram antes da janela imunológica (Tempo 252), e respectivo Tempo, Porteirinha/MG, 2010. | 55 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Distribuição da população de estudo segundo sexo, esquema vacinal, clínica, procedência e origem, Porteirinha, 2010. | 48 |
| Tabela 2: Frequência de alterações sugestivas da LVC, distribuídas por grupo, e seus respectivos intervalos de confiança, Porteirinha/MG, 2010. | 49 |
| Tabela 3: Análise do número de resultados positivos dos testes diagnósticos, por tipo de classificação clínica, em cães domiciliados em Porteirinha/MG, 2010. | 52 |
| Tabela 4: Análise do número de resultados positivos dos testes diagnósticos, por tipo de classificação clínica, entre os grupos vacinado e placebo, Porteirinha/MG, 2010. | 53 |
| Tabela 5: Frequência dos resultados do xenodiagnóstico realizado em cães que receberam vacina ou placebo, Porteirinha/MG, 2010. | 54 |

Lista de Siglas e Abreviaturas

AIDS: Acquired Imuno Deficiencie Sindrome, síndrome da imunodeficiência humana
BOD: Biochemical Oxygen Demand, demanda bioquímica de oxigênio
CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou
DEVEP/SVS/MS: Departamento de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
DNA: Ácido desoxirribonucléico
dNTP's: desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA: Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid, ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz
gp63: glicoproteína 63
HIV: Human Immunodeficiencie Virus, vírus da imunodeficiência humana
KCl: Cloreto de potássio
kDNA: DNA do cinetoplasto
LDPC: Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar
LIT: Liver Infusion Tryptose, infusão de fígado e triptose
LT: Leishmaniose Tegumentar
LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana
LV: Leishmaniose Visceral
LVA: Leishmaniose Visceral Americana
LVC: Leishmaniose Visceral Canina
LVH: Leishmaniose Visceral Humana
M: Molar
MHOM: Mamífero Homem
NaCl: cloreto de sódio
NNN: meio de cultura Novy McNeal e Nicolle
pb: pares de bases
PBS: Phosphate Buffered Saline, solução de fosfato tamponada
PCR: Polymerase Chain Reaction, reação em cadeia da polimerase
pH: potencial hidrogeniônico
pmol: picomol
PV: Peso Vivo
RIFI: Reação de Imuno-Fluorescência Indireta
RNA: Ácido ribonucléico
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate, dodecil sulfato de sódio
SFM: Sistema Fagocítico Mononuclear
SUS: Sistema Único de Saúde
TBE: Tris Borato EDTA
TDR: Tropical Disease Research
TE: Tris-EDTA
TRALd: Teste Rápido Anti *Leishmania donovani*
WHO: World Health Organization, Organização Mundial de Saúde

Sumário

| | |
|--|----|
| 1 Introdução | 18 |
| 1.1 As leishmanioses..... | 19 |
| 1.1.1 <i>Ciclo biológico</i> | 22 |
| 1.2 A leishmaniose visceral canina (LVC)..... | 23 |
| 1.2.1 <i>O diagnóstico da LVC</i> | 25 |
| 1.2.2 <i>Diagnóstico sorológico</i> | 26 |
| 1.2.3 <i>Diagnóstico parasitológico</i> | 27 |
| 1.2.4 <i>Diagnóstico molecular- PCR kDNA</i> | 28 |
| 1.2.5 <i>Xenodiagnóstico</i> | 29 |
| 1.3 Vacina Leish-Tec®..... | 32 |
| 1.4 Justificativa..... | 34 |
| 2 Objetivos | 35 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 36 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 36 |
| 3 Metodologia | 37 |
| 3.1 Área de estudo..... | 38 |
| 3.2 Identificação da amostra..... | 38 |
| 3.3 Caracterização clínica dos animais..... | 38 |
| 3.4 Critérios de inclusão..... | 39 |
| 3.5 Desenho do estudo..... | 39 |
| 3.5.1 <i>Determinação da taxa de infecção vetorial</i> | 40 |
| 3.6 Obtenção de flebotomíneos..... | 41 |
| 3.6.1 <i>Xenodiagnóstico</i> | 41 |
| 3.7 Exames sorológicos..... | 42 |
| 3.8 Coleta de amostras biológicas e eutanásia dos cães..... | 42 |
| 3.9 Exames moleculares..... | 43 |
| 3.9.1 <i>Extração de DNA</i> | 43 |
| 3.9.2 <i>Reação em cadeia da polimerase - PCR kDNA</i> | 43 |
| 3.10 Cronologia do estudo..... | 44 |
| 3.11 Análise estatística..... | 46 |
| 4 Resultados | 47 |
| 4.1 Descrição da amostra..... | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2 Classificação clínica dos cães..... | 48 |
| 4.3 Desempenho dos testes por grupo clínico..... | 50 |
| 4.4 Infectividade para flebotomíneos – xenodiagnóstico..... | 54 |
| 4.5 Visualização dos resultados da PCR kDNA..... | 55 |
| 4.6 Perdas..... | 55 |
| 5 Discussão..... | 56 |
| 5.1 Desempenho dos testes diagnósticos por grupo clínico..... | 58 |
| 5.2 Xenodiagnóstico e infectividade..... | 60 |
| 5.3 Limitações do estudo..... | 61 |
| 6 Conclusões..... | 64 |
| 7 Referências bibliográficas..... | 67 |
| 8 Anexos..... | 75 |
| 8.1 Relação dos animais amostrados..... | 76 |
| 8.2 Instrução Normativa Interministerial 31/2007..... | 79 |
| 8.3 Certificado Comitê de Ética em Pesquisa..... | 85 |

Introdução

1 Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica de grande importância médico-veterinária, causada por parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ross, 1903). A cadeia epidemiológica da leishmaniose visceral, no ciclo zoonótico, inclui a presença, concomitante, do vetor, do reservatório, do parasito e do hospedeiro susceptível (Deane, 1956). A LV é considerada uma doença reemergente em países do Mediterrâneo, Leste Europeu e na América Latina, em especial no Brasil (Desjeux, 2004). Nas formas antroponóticas da doença os humanos são os únicos reservatórios (Desjeux, 2004).

A atual estratégia de controle da LV zoonótica, preconizada pela OMS, está baseada na detecção e eutanásia de cães infectados, tratamento de casos humanos e controle do vetor. No Brasil o tratamento de cães infectados é proibido desde 2008, sendo o controle de reservatórios baseado na eutanásia de cães soropositivos, no controle da população vetorial através da borrifação residual de inseticida e manejo ambiental, na identificação e tratamento precoce dos casos humanos e no trabalho de educação em saúde (Brasil/MS/SVS, 2006).

A eficiência na retirada e eliminação dos reservatórios depende diretamente da qualidade, confiabilidade, sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos utilizados, que atualmente constituem-se de testes sorológicos, recomendados pelo Ministério da Saúde. Testes com baixa sensibilidade podem implicar em permanência de cães falso-negativos, com a possibilidade de manutenção do ciclo de transmissão. Já testes com baixa especificidade podem resultar na retirada de cães falso-positivos, não infectados, o que descredibiliza as ações de controle junto à população e aumenta o conflito de interesses entre órgãos de saúde pública e veterinários clínicos (Costa et al., 2013).

Uma alternativa à eutanásia de cães como método de controle são as vacinas anti-leishmaniose visceral canina (LVC), as quais têm sido um objeto de pesquisa muito explorado (Gradoni, 2001; Palatnik-de-Souza, 2008; Fernandes et al., 2008; Bongiorno et al., 2013; Fernandes et al., 2014; Oliva et al., 2014; Gradoni, 2015). Dye (1996) demonstrou, através de um modelo matemático, que uma vacina eficaz poderia ser capaz de reduzir a prevalência da infecção canina e da incidência da doença humana, tendo inclusive um desempenho superior quando comparado à eutanásia de cães.

Atualmente existem duas vacinas anti-LVC no Brasil. A Leishmune[®] (Pfizer Zoetis) foi lançada em 2004, mas sua licença de comercialização está suspensa desde setembro de 2014. A Leish-Tec[®] (Hertape Saúde Animal) está disponível no mercado desde 2009. Para regulamentar a pesquisa, produção e comercialização de vacinas anti-LVC no Brasil, os Ministérios da Saúde e da Agricultura publicaram a Instrução Normativa Interministerial

31/2007 (D.O.U. 10/07/2007). Esse documento estabeleceu as diretrizes para a pesquisa e as exigências mínimas para ensaios de fase III destinados à realização de estudos controlados, randomizados e mascarados para avaliar a eficácia de vacinas anti-LVC (Anexo 3).

Para atender a essas exigências, o laboratório Hertape iniciou, em agosto de 2008, um estudo intitulado “Ensaio Clínico de Fase III, randomizado, mascarado, controlado por placebo para avaliar a eficácia da vacina Leish-Tec[®] (Hertape Saúde Animal S.A.) anti-Leishmaniose Visceral Canina”. Esse estudo foi realizado no município de Porteirinha, norte do estado de Minas Gerais, área endêmica para LV, e teve duração de 24 meses.

Segundo a instrução normativa dos Ministérios da Saúde e da Agricultura, “os ensaios biológicos específicos relacionados às vacinas anti-LVC, durante a fase de desenvolvimento, **“devem avaliar a capacidade do cão vacinado para transmitir o agente ao vetor”**. Para responder a essa pergunta o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a infectividade para o vetor em cães vacinados com Leish-Tec[®], mantidos em área endêmica para LVC. A prevenção ou redução da transmissão do parasito do cão infectado para o vetor constitui um dos pré-requisitos para avaliação da eficácia das vacinas anti-LVC e de seu emprego como estratégia de controle da leishmaniose visceral canina e humana.

1.1 As leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas causadas por parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ross, 1903), o qual agrupa espécies de protozoários unicelulares, digenéticos (heteroxenos), pertencentes à ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae, encontrados nas formas: flagelada promastigota, no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e, amastigota, parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados.

Os hospedeiros invertebrados vetores das leishmanioses parecem estar limitados principalmente a insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae); todavia, a possível participação de outros grupos de artrópodes tem sido objeto de investigação (Coutinho et al., 2005, Coutinho e Linardi, 2007, Paz et al., 2010). Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos e, embora a infecção seja mais comumente encontrada em roedores e canídeos, também é conhecida entre edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos, primatas e, entre estes, o homem (Ashford, 2000). A infecção em aves e anfíbios nunca foi descrita, e os organismos encontrados parasitando os répteis, até bem pouco tempo considerados do gênero *Leishmania*, são atualmente aceitos como pertencentes ao subgênero *Sauroleishmania*, conforme descrito por Lainson e Shaw (1987) e parecem estar restritos ao Velho Mundo.

A transmissão do parasito ocorre através da picada da fêmea de flebotomíneo infectada; outras formas possíveis têm sido citadas, como a transmissão por transfusão sanguínea (Owens et al., 2001, de Freitas et al., 2006), por via transplacentária (Meinecke et al., 1999, Rosypal et al., 2005) e por contato sexual (Riera e Valladares, 1996, Silva et al., 2009).

De acordo com o tropismo apresentado pelo parasito, as leishmanioses podem ser classificadas em leishmaniose tegumentar (LT), quando as leishmanias se direcionam para a pele e mucosas (principalmente nasal e orofaríngea), e leishmaniose visceral (LV), quando os parasitos apresentam acentuado tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides. Espécies distintas de *Leishmania* têm preferências e causam lesões maiores ou menores, produzem ou não metástases e podem ser ou não auto-curáveis; apresentam características clínicas, patológicas e epidemiológicas diversas, em cada área geográfica, sendo então consideradas entidades nosológicas distintas (Ashford, 2000).

Classifica-se a LT de acordo com a manifestação clínica das lesões: formas que produzem lesões cutâneas, ulcerosas ou não, úmidas ou secas, porém limitadas são denominadas leishmaniose cutânea (LC) (Brasil/MS, 2006); formas que se complicam frequentemente, com o aparecimento de lesões destrutivas e mutilantes nas mucosas do nariz, boca e faringe, oriundas de metástases de lesão inicial cutânea e, associadas à infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Vianna, 1911), são designadas por leishmaniose mucosa (LM) ou cutâneo-mucosa (LCM). Estas podem ocorrer meses ou anos após remissão ou cura da lesão inicial cutânea, ou em alguns casos se apresentarem concomitantemente (Boaventura et al., 2006). Por último, existem formas cutâneas disseminadas, que ocorrem em indivíduos anérgicos com deficiente resposta imune celular, conhecidas como leishmaniose cutânea difusa (LCD), (Martinez et al., 2002; Brasil/MS, 2006).

A forma clínica da leishmaniose na qual ocorre a visceralização do parasito é conhecida por leishmaniose visceral (LV) ou calazar, uma enfermidade de evolução crônica, caracterizada por febre irregular, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia e estado de debilidade progressivo, que pode levar o paciente à morte se este não for submetido ao tratamento específico (WHO/TDR, 2007). A leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC), uma entidade distinta comum na Índia, se caracteriza por manifestações cutâneas que surgem após o tratamento e cura da leishmaniose visceral clássica (Ashford, 2000).

Atualmente as leishmanioses encontram-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo, afetando populações de 98 países, em 3 territórios, sendo que somente em 32 destes a notificação de casos da doença é compulsória, contribuindo para a deficiência

no conhecimento da real magnitude do problema. Espera-se a ocorrência de 2 milhões de novos casos de leishmanioses por ano (cerca de 500.000 novos casos de LV e 1.500.000 casos de LT), com uma prevalência estimada de 12 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo e uma população de 350 milhões de indivíduos expostos ao risco de contrair a doença (Alvar et al., 2012).

A LV, dada a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo HIV (WHO/TDR, 2007).

Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste. Duprey e colaboradores (2006) relataram a ocorrência de cães soropositivos para LV, predominantemente em animais da raça foxhound, nos Estados Unidos e no Canadá. Ainda não existem registros de casos humanos autóctones nos EUA e a transmissão por flebotomíneos ainda não foi demonstrada.

O Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (WHO/TDR/2007) estabeleceu a lista das 10 doenças infecciosas prioritárias no mundo; destas, 8 são doenças transmitidas por vetores. Essas doenças são responsáveis por um grande número de DALYs (“Disability Adjusted Life Years”-anos de vida potenciais perdidos), um indicador econômico que mede o número de anos de vida produtiva perdidos devido à morte prematura, incapacidade ou deficiência. Nessa lista as leishmanioses ocupam o terceiro lugar, contabilizando 59.000 mortes anuais, e 2.357.000 anos potenciais de vida perdidos (DALYs), perdendo apenas para a malária e filariose linfática (WHO, 2002). Do ponto de vista epidemiológico, as mudanças ambientais, o crescimento demográfico e o deslocamento de animais e seres humanos são fatores que contribuem para a modificação da distribuição biogeográfica das leishmanioses, assim como para a incorporação de novos hospedeiros (Romero e Boelaert, 2010). Essas mudanças confirmam as leishmanioses como sendo zoonoses reemergentes (Ashford, 2000).

Segundo Maurício e colaboradores (2000) as cepas de *L. chagasi* não podem ser distinguidas das cepas de *L. infantum*, o que indica que as mesmas sofreram uma separação geográfica recente. Baseados em estudos usando diferentes métodos, como RAPD combinado com RFLP, sequenciamento de DNA da protease de superfície (gp63) e hibridização com sondas de DNA, esses autores sugerem que os termos *L. chagasi* e *L. infantum* sejam usados como sinônimos. Já outro autor sugere que seja adotada a denominação de subespécie *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, considerando que ainda existem muitas questões a serem esclarecidas sobre a origem, identidade e epidemiologia do parasito causador da LVA (Shaw, 1994). Shaw (2006) afirma que uma das grandes falhas na validação da nomenclatura

de parasitos é o exame de um número limitado de cepas. Ele cita um exemplo ocorrido na África, quando somente após um grande número de isolados de *Leishmania* terem sido examinados é que se pôde concluir que na região circulava mais de uma espécie de parasito.

No Brasil, Deane (1956) estudando o calazar em Sobral, no Ceará, já apontava, precocemente, o importante papel do cão, não só como reservatório doméstico da doença, mas como elo essencial na manutenção da cadeia epidemiológica da leishmaniose visceral. Ao longo dos anos, fortes evidências foram se somando aos achados de Deane, o que corrobora para a conclusão dele: cães soropositivos, mesmo assintomáticos, podem apresentar intenso parasitismo cutâneo por formas amastigotas (Reis et al., 2006); cães assintomáticos, sem nenhum achado de sinal clínico da doença, podem ser fonte de infecção para flebotomíneos (da Costa-Val et al., 2007; Michalsky et al., 2007); em regiões onde a LV é endêmica a prevalência da infecção canina supera e precede a prevalência da doença humana (Romero e Boelaert, 2010); alguns animais podem permanecer por longos períodos sem apresentar nenhuma sintomatologia da doença, mesmo estando infectados, e na ausência de inquéritos sorológicos e programa de retirada de cães tornam-se importante fonte de infecção para flebotomíneos (Michalsky et al., 2007); até mesmo cães tratados ou vacinados podem ser infectivos para os flebotomíneos (Ribeiro et al., 2008; Miret et al., 2008; Bongiorno et al., 2013; Fernandes et al., 2014); em cidades onde houve retirada sistemática de todos os cães sororeativos a incidência do calazar humano diminuiu (Palatnik-de-Souza et al., 2001); apesar de algumas raças aparentemente serem mais resistentes à infecção por *Leishmania*, de um modo geral, todas são vulneráveis (Solano-Gallego et al., 2000; Miranda et al., 2008).

1.1.1 *Ciclo biológico*

Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, as fêmeas dos flebotomíneos ingerem macrófagos teciduais contendo em seu interior formas amastigotas de *Leishmania*, as quais, após ruptura celular, são liberadas no lúmen do trato digestivo dos insetos, quando o sangue ingerido ainda permanece fresco. Ainda dentro do bolo alimentar e envolto pela matriz peritrófica as leishmanias começam a se dividir por fissão binária e se diferenciam em formas promastigotas, alongadas com flagelo livre, colonizando o intestino dos flebotomíneos. Essas formas se transformam, então, em paramastigotas, aderidas ao epitélio por junções chamadas hemidesmossomas. Posteriormente ocorre nova transformação para promastigotas, dessa vez formas extremamente ágeis que nadam livremente – as promastigotas metacíclicas; ao exercer outro repasto sobre um hospedeiro susceptível, o flebotomíneo inocula esses parasitos presentes no trato digestivo anterior, probóscide, faringe e esôfago. No local onde ocorreu a picada do inseto vetor as formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células do

SFM, macrófagos teciduais e granulócitos neutrófilos. As formas promastigotas metacíclicas se transformam em amastigotas, dentro do vacúolo fagocitário, se dividem rapidamente e quando o macrófago está densamente parasitado o vacúolo se rompe liberando as amastigotas, que serão novamente fagocitadas por outros macrófagos (Lainson e Shaw, 1988).

1.2 A leishmaniose visceral canina (LVC)

A LVC é uma doença multisistêmica, com sinais clínicos muito variáveis. A maioria dos cães apresenta pobre condição corporal, atrofia muscular generalizada, linfadenopatia e alterações na pele. O achado histopatológico típico em seus tecidos é uma reação inflamatória granulomatosa, associada com a presença de formas amastigotas dentro de macrófagos. As mudanças dérmicas na LVC incluem dermatite exfoliativa, nodular, pustular e ulcerativa; ocorre decréscimo na produção de colágeno tipo I e aumento do colágeno tipo III proporcional à gravidade das lesões de pele e destruição dos tecidos (Koutinas et al., 1999; Giunchetti et al., 2006).

Devido à sua íntima relação com o homem, o cão doméstico é apontado como principal reservatório de *L. infantum* na China e no Mediterrâneo; e de *L. chagasi* nas Américas (Ashford, 1996; Moreno e Alvar, 2002; Desjeux, 2004; Lainson e Rangel, 2005). A doença canina é considerada, do ponto de vista epidemiológico mais importante que a doença humana, pois, além de ser mais prevalente, apresenta grande contingente de animais assintomáticos albergando parasitas na derme, com potencial para transmitir a doença (Marzochi et al., 1985). Os caninos domésticos são responsabilizados pela dispersão da doença a partir de focos enzoóticos. A doença no cão geralmente precede a ocorrência da doença no homem, sendo que ambas coexistem em todos os focos conhecidos (Badaró et al., 1996).

Cães infectados por *L. infantum* desenvolvem lesões cutâneas e viscerais a despeito da natureza viscerotrópica desse protozoário. Essas lesões são ricas em parasitos, muito embora pele sadia de cães assintomáticos também seja fonte de amastigotas, possibilitando a infecção de flebotomíneos (Manna et al., 2004, Michalsky et al., 2007; da Costa-Val et al., 2007). Entretanto a infecção no cão não significa, necessariamente, doença ativa (Moreno e Alvar, 2002). O espectro de manifestações clínicas dependerá do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado (Barbiéri, 2006). As características clínicas do calazar canino variam muito, devido a numerosos mecanismos patogênicos envolvidos na evolução da doença e à diversidade de resposta imune desenvolvida pelos diferentes indivíduos (Mancianti et al., 1988). Os sinais clínicos e o tempo transcorrido até o aparecimento da doença variam enormemente, de dois meses a sete anos, podendo o cão nunca desenvolver a doença

(Slappendel e Greene, 1990; Gaeta et al., 1994). Em um estudo de infecção experimental, Rodríguez-Cortés e colaboradores (2007) observaram que os sintomas da LVC apareciam entre 4 e 7 meses após a inoculação dos parasitos.

A história natural e a evolução do calazar canino variam amplamente entre os indivíduos infectados. Muitos cães nunca evoluem para doença, através de mecanismos não muito bem conhecidos de auto-cura, outros ficam gravemente afetados progredindo rapidamente para morte (Genaro, 1993).

Mancianti e colaboradores (1988), estudando a leishmaniose visceral canina por *L. infantum* na ilha de Elba, na Itália, classificaram a doença de acordo com a sintomatologia clínica: animais sem sinais clínicos foram denominados assintomáticos; os que demonstravam adenopatia, pequena perda de peso e pêlo opaco foram denominados oligosintomáticos; por último aqueles que mostravam todos ou parte dos sinais graves da enfermidade (perda de pêlo, eczema furfuráceo, úlceras, onicogribose, ceratoconjuntivite, entre outros) foram classificados como cães sintomáticos.

Em estudo de infecção experimental, Genaro (1993) verificou que cães inoculados com *L. chagasi* podem evoluir de quatro formas basicamente diferentes:

- 1- Evolução frusta: os animais não apresentam qualquer alteração visível. São detectados parasitos, em algum momento após a inoculação, mas estes desaparecem em seguida.
- 2- Evolução regressiva espontânea: os animais apresentam, durante a fase inicial da doença, parasitismo transitório de medula óssea, coincidente com o período de emagrecimento. Em seguida ocorre retomada do ganho de peso, sem apresentação de qualquer outro tipo de alteração.
- 3- Evolução aguda: os cães apresentam parasitismo de medula óssea e pele, emagrecimento acentuado durante todo o curso da infecção, associado com alopecia, descamações e lesões crostosas por todo o corpo, onicogribose, envolvimento ocular e nasal, e, finalmente, evolução para caquexia, com sobrevida curta.
- 4- Evolução crônica: os animais apresentam parasitismo de medula óssea e pele, emagrecimento leve ou moderado durante todo o curso da infecção, alopecia, lesões crostosas, onicogribose, apatia, edema de membros, adenopatia, todos os sinais com intensidade de leve a moderada; possuem sobrevida longa.

No caso de cães que desenvolvem a doença, ocorre uma depleção da região das células T dos seus órgãos linfóides, enquanto a zona de células B desses órgãos prolifera. A excessiva proliferação de células B e macrófagos resulta em hepatoesplenomegalia, linfadenopatia generalizada e hipergamaglobulinemia (Strauss-Ayali et al., 2004). O aumento de produção

de gamaglobulinas não conduz à proteção, mas, ao contrário, é potencialmente prejudicial. Um importante dano causado pela hipergamaglobulinemia é a produção de grande quantidade de imunocomplexos circulantes, que, uma vez depositados nas paredes dos vasos sanguíneos, resultam em vasculites, poliartrites, uveítes e glomerulonefrites. Essas manifestações são acompanhadas por alterações hematológicas e bioquímicas, como anemia normocítica normocrômica, trombocitopenia, leucopenia e aumento das proteínas totais do soro com inversão da relação albumina-globulina. Eletroforese de proteínas revela um decréscimo na concentração de albuminas, com aumento combinado de beta e gama-globulinas (Santos-Gomes, 2003).

Deve-se considerar que o aparecimento de sinais clínicos da leishmaniose visceral em cães está intimamente relacionado não só a fatores intrínsecos como tipo de resposta imune e suscetibilidade individual do animal, mas também a condições extrínsecas como padrão nutricional, desafio por ecto e endoparasitos, grau de exposição ambiental, condições de higiene das instalações e manejo sanitário (Silva, 2009).

A epidemiologia da leishmaniose visceral canina passa por um processo de mudança, desde os anos 80, em íntima associação com o processo de urbanização. Contudo, as medidas de controle dessa zoonose continuam as mesmas: redução da população vetorial por inseticidas residuais e manejo ambiental, diagnóstico da infecção canina com eliminação dos cães positivos e tratamento dos casos humanos (Nunes et al., 2008). Em estudo realizado no município de Araçatuba/SP, área endêmica para LV, observou-se que, em um período de 2 anos, 60,9% da população canina foi recolhida e eliminada pelo serviço de Controle de Zoonoses do município, sendo que destes, somente 26,7% tinham sorologia positiva para calazar. A reposição dos animais foi realizada em 39% dos casos, em muitos por dois ou mais cães, na maioria filhotes, sabidamente mais susceptíveis a várias doenças infecciosas, incluindo a LVC. Dentre os animais de reposição, ou seja, os que foram introduzidos na residência dos que foram recolhidos, 13% já eram soropositivos no primeiro exame; após um período de observação de 32 meses, 42% se tornaram positivos. É interessante a observação dos autores que, apesar da ocorrência prévia de cães com LVC nas residências acompanhadas, nenhuma medida de prevenção contra a doença foi adotada pelos proprietários (Nunes et al., 2008).

1.2.1 *O diagnóstico da LVC*

De um modo geral o diagnóstico da LVC vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública, principalmente devido à inexistência de testes com alta

sensibilidade e especificidade, de baixo custo e de fácil implantação e operacionalização na rotina dos serviços.

Atualmente, o Ministério da Saúde recomenda que o diagnóstico laboratorial da LVC seja baseado nos exames sorológico ou parasitológico (Brasil/MS/SVS, 2006).

1.2.2 Diagnóstico sorológico

Devido à maior rapidez e menor custo, os testes sorológicos são os mais empregados pelos programas de controle da LVC sendo seu uso recomendado em inquéritos caninos amostrais ou censitários para avaliar a soroprevalência canina. O protocolo atualmente recomendado pelo Ministério da Saúde é a triagem pelo teste rápido DPP[®] Leishmaniose Visceral Canina (Biomanguinhos) com confirmação pelo ELISA (Biomanguinhos). Esse protocolo substituiu o anterior, no qual era feita a triagem pelo ELISA (Biomanguinhos) com confirmação pela RIFI (Biomanguinhos).

A boa aplicabilidade dos testes sorológicos no diagnóstico da LVC é pautada no fato de que animais doentes manifestam uma intensa resposta imune humoral, apresentando altos níveis de IgG anti-*Leishmania* spp.. A soroconversão pode ocorrer, em média, após 3 meses de infecção e os títulos podem permanecer altos por, pelo menos, dois anos. Contudo, os testes sorológicos devem ser interpretados com cuidado, pois não são 100% sensíveis e falham em identificar animais no período pré-patente e antes da soroconversão, em alguns cães que nunca farão a soroconversão e outros que, após a soroconversão, se convertem em soronegativos, ainda que permaneçam infectados (Genaro, 1993; Leontides et al., 2002). Animais com até 3 meses de idade podem apresentar anticorpos maternos e, portanto, apresentarem resultados falso-positivos (Braga et al., 1998; Regina-Silva et al., 2014). Além disso, cuidado especial deve ser tomado com relação a possibilidade de reações cruzadas com outras parasitos tais como, *Babesia canis*, *Erlíquia canis*, *Trypanosoma* spp., entre outros (Oliva et al., 2014; Zanette et al., 2014), principalmente no diagnóstico clínico individual.

Na RIFI os resultados considerados positivos são aqueles que apresentam títulos iguais ou maiores que a diluição de 1:40 (ponto de corte). Da Costa e colaboradores (1991) observaram que a RIFI apresenta reação cruzada em amostras de cães com leishmaniose tegumentar em 75% dos casos, e com amostras de cães com doença de Chagas em 83,3%. Além da ocorrência de reações cruzadas, a RIFI possui o inconveniente de exigir pessoal altamente treinado para leitura das lâminas, incluindo o fato da tarefa ser demorada e o

critério de interpretação dos resultados muito subjetivo, principalmente em caso de baixos títulos de anticorpos.

O ELISA é uma técnica quantitativa de dosagem de anticorpos, porém com algumas limitações como níveis de especificidade baixos, principalmente quando se utilizam antígenos brutos (Reed, 1996; Peixoto et al., 2015); costuma apresentar sensibilidade maior e especificidade menor, em comparação com a RIFI. O ELISA é capaz de identificar baixos níveis de anticorpos, porém é pouco preciso na detecção de casos pré-clínicos ou assintomáticos.

O Dual Path-Plataform DPP[®]LVC (Biomanguinhos) é um teste rápido imunocromatográfico à base de ouro coloidal concebido para detectar anticorpos específicos aos antígenos rK9, rK26 e rK39 de *L.infantum*. Um estudo recente demonstrou que o DPP[®]LVC possui sensibilidade de 98% em cães sintomáticos, mas detecta apenas 47% dos cães assintomáticos, o que colocou em dúvida a eficácia do protocolo atual (Grimaldi et al., 2012).

Até dezembro de 2011, o Ministério da Saúde do Brasil recomendava o uso do ELISA e RIFI para diagnosticar a infecção por *Leishmania* em cães. Além da sensibilidade e especificidade insatisfatórias, que podem contribuir para a manutenção de animais infectados em áreas endêmicas ou para a retirada de animais falso-positivos, existe ainda a limitação do intervalo de tempo entre a coleta do exame e o resultado (Couternay et al., 2002). Muitos municípios não possuem autonomia na realização desses testes, o que aumenta ainda mais o intervalo entre coleta de amostra e retirada do animal positivo. Nesse sentido, o DPP[®]LVC oferece a vantagem de ser um teste rápido, com resultado em cerca de 10 minutos. É de fácil execução e pode ser realizado inclusive em condições de campo.

1.2.3 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico é o método de certeza e se baseia na demonstração do parasito obtido de material biológico mais comumente obtido de punções hepática, esplênica, de medula óssea, de linfonodos e biópsia ou escarificação de pele. O exame parasitológico é classicamente utilizado para confirmar a LVC pela demonstração direta do parasito. Os mais utilizados são o exame microscópico de esfregaços por aposição de tecidos, o isolamento do parasito em meios de cultura e a inoculação em hamster. Estes métodos detectam o parasito em animais com doença patologicamente confirmada em menos de 80% dos casos (Moreno e Alvar, 2002). Esta sensibilidade é dependente da quantidade de parasitos presentes ou carga parasitária, tipo de material biológico e do tempo de leitura da lâmina, sendo menor nos assintomáticos que nos sintomáticos (Solano-Gallego et al., 2011). A sensibilidade também

pode ser diminuída devido a problemas de contaminação da cultura, inexperiência na leitura de lâminas e às dificuldades na manutenção de hamsters por um período relativamente longo de incubação. A detecção de parasitos pelo exame microscópico de esfregaços de tecidos é dependente da presença de muitos organismos no aspirado ou na amostra de tecido coletada. Análises histopatológicas de órgãos infectados tais como baço, fígado, linfonodos e pele, podem também ser utilizadas para detectar parasitos intracelulares (Tafari et al. 2001; Quaresma, 2007). Os métodos parasitológicos são fundamentais para a pesquisa, para que se possa calcular a sensibilidade e especificidade de outros testes, uma vez que a taxa de acerto é calculada em cima do caso confirmado-parasitológico positivo. O diagnóstico parasitológico também é desejável e oferece segurança ao profissional nas decisões de conduta na rotina da clínica individual. Entretanto, são inapropriados para estudos epidemiológicos de grande escala e principalmente para subsidiar as ações de controle.

1.2.4 Diagnóstico molecular – PCR kDNA

Rodgers e colaboradores (1990) foram os pioneiros na utilização da técnica de PCR para identificação de DNA de *Leishmania*, tendo como alvo as moléculas do minicírculo do kDNA. Esses autores demonstraram a elevada sensibilidade do método, capaz de detectar o kDNA equivalente a um único parasito.

Desde então métodos diagnósticos utilizando o DNA têm sido exaustivamente explorados visando superar as inúmeras limitações que os métodos diagnósticos de rotina apresentam. Vários trabalhos têm mostrado que os ensaios moleculares permitem uma detecção rápida e sensível de diversas doenças parasitárias, incluindo as leishmanioses, além da possibilidade de caracterização dos microrganismos. Peixoto e colaboradores (2015) sugerem que a PCR tem potencial para ser utilizada em substituição ao diagnóstico parasitológico clássico para definição de caso confirmado ou padrão-ouro.

Diferentes protocolos já foram utilizados para detecção de *Leishmania* em amostras de cães (Ferroglia et al., 2006; Maia et al., 2009; Quaresma et al., 2011; Regina-Silva et al., 2014) e flebotomíneos (Michalsky et al., 2007) tendo como alvo a região conservada do minicírculo do kDNA. Os métodos de PCR que utilizam como alvo regiões do kDNA têm demonstrado ser mais sensíveis do que os que utilizam DNA genômico. Essa maior sensibilidade parece estar relacionada ao número de cópias do alvo, que no caso do DNA dos minicírculos chega a cerca de 10.000 cópias (Nasereddin et al., 2006).

1.2.5 Xenodiagnóstico

A figura 1 é uma revisão dos trabalhos indexados na base de dados PUBMED, que realizaram a técnica de xenodiagnóstico em cães diagnosticados com leishmaniose. Do total de 18 publicações, duas referem-se a estudos com vacinas anti-LVC (Bongiorno et al., 2013; Fernandes et al., 2014) e três a estudos de tratamento da LVC (Miret et al., 2008; Ribeiro et al., 2008; da Silva et al., 2012). Um único trabalho determinou a infectividade em cão portador de leishmaniose tegumentar (Hernández et al., 2006). Os demais avaliaram aspectos diversos relacionados à infectividade, como por exemplo, a associação de infectividade e sintomatologia, entre outros.

Figura 1: Resumo dos trabalhos científicos indexados no PUBMED, que realizaram a técnica do xenodiagnóstico em cães.

| Ano | Autores | Entidade clínica | N* | Regime/Origem do cães | Nº flebotomíneos | Espécie | Local/País | Verificou infecção por | Critério de inclusão | Grupos clínicos | Resultados |
|-------|------------------|------------------|----|--|------------------|---|-----------------------|------------------------|---|--------------------------------------|---|
| 1994 | Molina et al. | LVC | 16 | infecção natural | NI | <i>P. perniciosus</i> | Madrid/Espanha | dissecação | sorologia e parasitológico | assintomáticos, oligo e sintomáticos | Infectividade estatisticamente igual entre grupos clínicos. |
| 2000A | Guarga et al. | LVC | 12 | infecção natural | 75 | <i>P. perniciosus</i> | Zaragoza/Espanha | dissecação | sorologia e parasitológico | assintomáticos, oligo e sintomáticos | Infectividade estatisticamente igual entre grupos clínicos. Xenodiagnóstico direto estatisticamente superior ao xenodiagnóstico indireto (ex vivo). Os autores concluíram que o xenodiagnóstico indireto não é um bom método alternativo. |
| 2000B | Guarga et al. | LVC | 24 | infecção natural | 75 | <i>P. perniciosus</i> | Zaragoza/Espanha | dissecação | sorologia e parasitológico | - | Baixa contagem de Linfócitos TCD4+ associada significativamente a alta infectividade. |
| 2001 | Travi et al. | LVC | 20 | 3 infecção experimental, 17 infecção natural | 30-60 | <i>L. longipalpis</i> , <i>L. youngi</i> | Colômbia | dissecação | sorologia, parasitológico, PCR | assintomáticos, oligo e sintomáticos | Associação positiva entre infectividade e sintomatologia. Cães assintomáticos não foram infectivos mesmo em xenos múltiplos. |
| 2002 | Courtenay et al. | LVC | 50 | cães sentinelas | 8-160 | <i>L. longipalpis</i> | Ilha de Marajó/Brasil | dissecação | cultura QU PCR QU sorologia | assintomáticos, oligo e sintomáticos | Correlação positiva entre infectividade, IgG anti-leishmania, PCR e doença clínica. Infectividade ocorre em média 300 dias após infecção e 100 dias após soroconversão. |
| 2002 | Travi et al. | LVC | 2 | infecção natural | NI | <i>L. longipalpis</i> , <i>L. shannoni</i> , <i>L. evansi</i> , <i>L. youngi</i> | Colômbia | dissecação | não informado | - | Os autores demonstraram que outros vetores podem se infectar com o parasito (vetores permissíveis). |
| 2006 | Hernández et al. | LT | 2 | infecção natural | 455 ^b | <i>L. youngi</i> | Trujillo/Venezuela | dissecação e PCR | clínica (lesão típica) com confirmação parasitológica | - | Infectividade menor que 1% (0,88%), em um único evento, por <i>Leishmania Viannia</i> em <i>L. youngi</i> |

| | | | | | | | | | | | |
|------|-------------------------|-----|----|---|-------|-----------------------|------------------|--|--|---|---|
| 2007 | Costa Val <i>et al.</i> | LVC | 42 | cães errantes (CCZ) mantidos em canil experimental durante o estudo | 45 | <i>L. longipalpis</i> | RMBH/Brasil | dissecação | sorologia | assintomáticos, oligo e sintomáticos | Associação positiva entre infectividade e sintomatologia. Cães com maiores níveis de IgG e hematócrito mais baixos são os que infectam a maior proporção de vetores. |
| 2007 | Michalsky <i>et al.</i> | LVC | 18 | cães errantes (CCZ) | 20 | <i>L. longipalpis</i> | MOC/Brasil | PCR kDNA | sorologia e teste rápido (TRALd) | assintomáticos, oligo e sintomáticos | Associação positiva entre infectividade e sintomatologia, cães sintomáticos 5 vezes mais infectivos que os demais. |
| 2008 | Verçosa <i>et al.</i> | LVC | 14 | infecção natural. Cães errantes e de proprietários | 60 | <i>L. longipalpis</i> | Terezina/Brasil | dissecação | sorologia e parasitológico | assintomáticos e sintomáticos | Cães sintomáticos foram infectivos; assintomáticos não ($p<0,05$). |
| 2008 | Ribeiro <i>et al.</i> | LVC | 12 | cães errantes (CCZ) mantidos em canil experimental durante o estudo | 40 | <i>L. longipalpis</i> | RMBH/Brasil | dissecação | sorologia e parasitológico | assintomáticos, oligo e sintomáticos | Redução significativa da carga parasitária e da infectividade em cães tratados com glucantime lipossomal ($p<0,05$) |
| 2008 | Miret <i>et al.</i> | LVC | 30 | cães errantes (CCZ) mantidos em canil experimental | 20 | <i>L. longipalpis</i> | RMBH/Brasil | PCR kDNA | sorologia, exame parasitológico direto, cultura | assintomáticos, oligo e sintomáticos | Todos os animais tratados com glucantime foram infectivos e parte dos animais tratados com imunoterapia (glucantime + vacina). |
| 2011 | Amorim <i>et al.</i> | LVC | 48 | cães errantes (CCZ) mantidos em canil experimental | 50 | <i>L. longipalpis</i> | RMBH/Brasil | dissecação | sorologia e PCR | sintomáticos | Correlação positiva entre xeno e imunohistoquímica ($p=0,001$). Cães negativos em ambos os testes tem carga parasitária menor que cães positivos nos dois ($p=0,001$). |
| 2011 | Soares <i>et al.</i> | LVC | 35 | cães errantes (CCZ) | 60 | <i>L. longipalpis</i> | Terezina/Brasil | dissecação e PCR em amostras independentes | sorologia, exame parasitológico direto, cultura | assintomáticos* e sintomáticos | Cães sintomáticos mais infectivos que os assintomáticos, tanto por dissecação quanto por PCR ($P<0,05$). Maior proporção de flebotomíneos positivos por PCR em relação a dissecação ($p=0,001$) nos dois grupos. |
| 2012 | da Silva <i>et al.</i> | LVC | 52 | canil experimental | 40-50 | <i>L. longipalpis</i> | RMBH/Brasil | dissecação | sorologia e PCR | classificação I, II, III e IV que considera estado clínico, títulos de anticorpos, alterações bioquímicas e hematológicas | Cães tratados com glucantime lipossomal e alopurinol se tornaram não infectivos no xenodiagnóstico. 50% dos cães foram considerados curados (T200): cultura de MO negativa, qPCR de medula, pele, baço, fígado negativos, xeno negativo. |
| 2013 | Laurenti <i>et al.</i> | LVC | 38 | cães errantes (CCZ) | 50 | <i>L. longipalpis</i> | Araçatuba/Brasil | dissecação e PCR | sorologia e parasitológico | assintomáticos e sintomáticos | Clínica dos cães diretamente relacionada com títulos de anticorpos e inversamente relacionada à infectividade (93% nos Assint. E 67% nos sint.) |
| 2013 | Bongiorno <i>et al.</i> | LVC | 10 | desafio natural (sentinelas) | 60 | <i>P. perniciosus</i> | Europa | dissecação | cães vacinados/controlados expostos ao desafio natural | assintomáticos e sintomáticos | Não houve diferença estatística na taxa de infectividade entre vacinados e não vacinados. Contudo, foi encontrada diferença estatística para a intensidade de infecção (> 500 parasitos) e para o número de flebotomíneos infectados ($p<0,0001$) entre os grupos. |
| 2014 | Fernandes <i>et al.</i> | LVC | 76 | desafio natural (soronegativos) | 40 | <i>L. longipalpis</i> | Bahia/Brasil | PCR RV1 e RV2 | cães vacinados/controlados expostos ao desafio natural | assintomáticos e sintomáticos | Não foram encontradas diferenças com relação à infectividade, parasitismo, sintomas clínicos e produção de IgG entre animais vacinados com leishmune ou com leish-Tec. Correlação positiva entre detecção do parasito, sintomas e infectividade. |

* Amostra do xenodiagnóstico

^ 455 flebotomíneos divididos em três eventos.

Dentre as conclusões desses trabalhos destaca-se que a maioria deles encontrou associação positiva entre infectividade e sintomatologia clínica (Travi *et al.*, 2001; Couternay *et al.*, 2002; da Costa-Val *et al.*, 2007; Michalsky *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2011). Já o trabalho de Laurenti e colaboradores (2013) foi o único a encontrar correlação inversa entre intensidade de sintomas e infectividade.

Em estudo europeu, Molina *et al.* (1994) analisaram a infectividade de *Phlebotomus perniciosus* alimentados em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Seus resultados mostraram que, apesar da grande variabilidade de porcentagens de fêmeas alimentadas e

infectadas dentro de cada grupo clínico, não existiu uma diferença estatística entre os grupos, sendo a infectividade de flebotomíneos independente do estado clínico do cão. O trabalho de Guarga e colaboradores (2000) também não encontrou associação entre infectividade e sintomas clínicos.

Courtenay et al., (2002) realizaram estudo de infectividade para o vetor em 50 cães sentinelas expostos à infecção natural por *L. chagasi*. Os cães se tornaram infectivos após uma média de 333 dias de permanência na área endêmica e 105 dias após a soroconversão. Os autores encontraram uma correlação positiva entre infectividade, IgG anti-*Leishmania*, presença do DNA do parasito e intensidade da doença clínica.

Da Costa-Val et al. (2007) e Michalsky et. al (2007) demonstraram uma associação positiva entre as taxas de infecção de *L. longipalpis* e o estado clínico de cães. Fêmeas do vetor alimentadas em cães sintomáticos mostraram maior taxa de infecção em comparação com aquelas alimentadas em cães assintomáticos. Esses autores observaram, também, que as maiores taxas de infecção de *L. longipalpis* ocorreram nos insetos que alimentaram em cães com altos títulos de anticorpos detectados pela RIFI.

Verçosa e colaboradores (2008) avaliaram a infectividade, a resposta inflamatória e o parasitismo em cães da área endêmica de Terezina/PI. Nesse estudo, seis entre nove cães sintomáticos foram infectivos para *L. longipalpis*, enquanto que nenhum dos assintomáticos infectou os flebotomíneos. As formas amastigotas de *Leishmania* também foram visualizadas somente na pele dos animais sintomáticos. No trabalho de Travi e colaboradores (2001), cães sem sintomas clínicos da doença também não foram capazes de infectar os flebotomíneos.

Soares e colaboradores (2011) avaliaram a infectividade para o vetor em cães com LVC, comparando o método de dissecação, no qual há visualização direta do parasito, com o método de PCR, onde se detecta a presença de DNA de *Leishmania* nas amostras de flebotomíneos. Utilizando a PCR como método de avaliação, foi possível demonstrar uma taxa de infectividade de 13% entre os cães sintomáticos, contra 3,5% nos assintomáticos. Já pelo método de dissecação somente os sintomáticos foram infectivos em um percentual de 1,6%. Nesse trabalho a infectividade avaliada por PCR foi estatisticamente mais sensível que pela dissecação. Além desse trabalho, Michalsky e colaboradores (2007), Miret e colaboradores (2008) e Laurenti e colaboradores (2013) foram os que utilizaram a PCR como método de avaliação da infectividade no xenodiagnóstico.

Por último, os trabalhos de, Bongiorno e colaboradores (2013), que avaliaram a vacina Canileish[®] (Virbac) e, Fernandes e colaboradores (2014), que avaliaram as vacinas Leish-Tec[®] (Hertape) e a Leismune[®] (Pfizer/Zoetis) são os únicos que contemplam a utilização da técnica de xenodiagnóstico em estudos vacinais. Uma redução na transmissão de 36,6%, no

grupo controle, para 5.1% e 5.4%, nos grupos vacinados, com Leishmune[®] e Leish-Tec[®], respectivamente, foi encontrada no trabalho de Fernandes e colaboradores. Já no trabalho de Bongiorno, não foi encontrada redução da infectividade entre os grupos vacinado e controle, porém houve redução estatística no número de flebotomíneos infectados por cão, e na intensidade de infecção por flebotomíneo infectado, ou seja, dentre os cães vacinados que infectaram os flebotomíneos, houve um número menor de flebotomíneos parasitados e a intensidade de infecção nesses foi menor, quando comparado ao grupo controle.

1.3 Vacina Leish-Tec[®]

Entre as três vacinas anti-LVC disponíveis comercialmente em todo o mundo, Leish-Tec[®] é uma formulação com base na proteína recombinante A2 de *L. (L.) donovani*, produzida em *Escherichia coli*, sob a forma de proteína (ou antígeno) recombinante e saponina como adjuvante. A proteína A2 é expressa nas formas amastigotas de algumas espécies de *Leishmania*, como *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* (Coelho et al., 2003). Leish-Tec[®] demonstra capacidade de induzir resposta imune celular em cães, caracterizada pela indução de níveis elevados de IFN- γ , e humoral, caracterizada pela produção de anticorpos específicos contra o antígeno vacinal, porém, que não reagem com o extrato bruto ou solúvel das formas promastigotas de *Leishmania* (Fernandes et al., 2008). Sendo assim, após a vacinação com Leish-Tec[®] é possível distinguir animais vacinados de animais infectados por meio de testes sorológicos convencionais que empregam antígenos de formas promastigotas de *Leishmania*.

Vários ensaios pré-clínicos em camundongos forneceram evidências das respostas protetoras induzidas pela vacinação com o antígeno A2 de amastigota, em combinação com diferentes adjuvantes, contra a leishmaniose visceral (Coelho et al., 2003; Ghosh et al., 2001a, Ghosh et al., 2001b; Zanin et al., 2007; Resende et al., 2008; Mizbani et al., 2009). Um estudo recente, realizado em macacos Rhesus também demonstrou o efeito protetor de A2 induzido por protocolo de primo-vacinação com a proteína recombinante A2 e adenovírus expressando A2 (Grimaldi et al., 2014). A vacinação com Leish-Tec[®] demonstrou induzir imunidade protetora contra a infecção induzida por alta dose intravenosa de *L. (L.) infantum chagasi* em beagles (Fernandes et al., 2008). Leish-Tec[®] também foi testada em populações caninas heterogêneas, e demonstrou ser segura e bem tolerada pelos animais. Além disso, Leish-Tec[®] não induz soroconversão em animais vacinados, um requisito importante para a utilização de vacinas como medida de controle adicional em áreas endêmicas, onde a eutanásia de cães soropositivos é recomendada como uma estratégia de controle da LV (Testasica et al., 2014).

Em um estudo recente realizado no estado da Bahia, demonstrou-se que apenas 2 dos 37 (5,4%) animais vacinados com Leish-Tec[®] foram positivos no xenodiagnóstico, enquanto que 36,6% dos cães do grupo controle foram infectivos para os flebotomíneos (Fernandes et al., 2014). Atualmente a Leish-Tec[®] é a única vacina anti-LVC licenciada pelas autoridades brasileiras de saúde pública, para a venda e administração por médicos veterinários, restrito ao uso individual. No entanto, para demonstrar de forma inequívoca a sua eficácia e potencial como uma medida adicional de controle, um teste de campo de fase III foi exigido pelo Ministério da Saúde do Brasil.

1.4 Justificativa

Considerando a importância do cão como reservatório de *Leishmania infantum*, e seu papel essencial na manutenção do ciclo zoonótico de transmissão da leishmaniose visceral urbana; o crescente processo de urbanização, expansão e reemergência da LVC e LVH no Brasil e no mundo; a falta de sucesso das medidas tradicionais de controle da doença; a demanda cada vez mais crescente por métodos alternativos à eutanásia canina e a possibilidade do desenvolvimento e uso de vacinas anti-LVC como medida auxiliar ao controle da doença, esse estudo objetivou avaliar a infectividade para *Lutzomyia longipalpis* em cães vacinados com Leish-Tec[®], que foram expostos à infecção natural em área endêmica para LVC, uma vez que nenhum outro estudo dessa magnitude foi realizado até o momento. Esse estudo também objetivou avaliar o desempenho dos demais testes diagnósticos utilizados na amostra de cães selecionados para o xenodiagnóstico, em especial para investigar a diferença de resultados entre cães com ou sem sintomas sugestivos da doença e suas implicações na interpretação dos resultados do ensaio.

Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a transmissibilidade de *Leishmania* spp. em cães vacinados com Leish-Tec[®], ou que receberam placebo, para a espécie *L. longipalpis*, após 18 meses de exposição ao desafio natural em área endêmica para LVC.

2.2 Objetivos específicos

Determinar a taxa de infecciosidade dos cães para os flebotomíneos, nos grupos vacinado e placebo, e estimar a eficácia vacinal para prevenção da transmissão.

Comparar a taxa de positividade dos testes utilizados (RIFI, ELISA, Xenodiagnóstico, Parasitológico e teste rápido - Kalazar DetectTM) entre os grupos clínicos sintomático e assintomático para amostra total de cães.

Comparar a taxa de positividade dos testes utilizados (RIFI, ELISA, Xenodiagnóstico, Parasitológico e teste rápido- Kalazar DetectTM) entre os grupos clínicos sintomático e assintomático, estratificado por tratamento: vacinado e placebo.

Metodologia

3 Metodologia

3.1 Área de estudo

A área de estudo escolhida para a realização do presente trabalho foi o município de Porteirinha, estado de Minas Gerais, Brasil. Porteirinha está localizada na área mineira do polígono das secas, mesorregião semi-árida do Norte de Minas, microrregião da Serra Geral.



Figura 2: Localização geográfica de Porteirinha, MG.

O município de Porteirinha possui 37.627 habitantes (IBGE, 2010) sendo atualmente classificado, segundo o Ministério da Saúde, em área de transmissão moderada de leishmaniose visceral (MS/SVS, 2009). A área foi escolhida por ser conhecida a prevalência da LVC na série temporal dos últimos seis anos, e também porque o programa de controle da LV (eutanásia de cães com sorologia positiva e controle vetorial) estava interrompido neste município desde 2004. Sendo assim, o município preenchia os pré-requisitos exigidos pelos Ministérios da Saúde e da Agricultura para realização de ensaios de fase III para estudo de eficácia de vacinas anti-LVC (anexo II).

3.2 Identificação da amostra

Cada animal selecionado para o estudo foi cadastrado no banco de dados do Ensaio Clínico através de um código composto por três números e uma letra (ex: H-526). Para garantir a identificação, todos os eleitos foram biochipados (Animalltag®) no dorso (região da cernelha) no momento da aplicação da primeira dose de vacina/placebo.

3.3 Caracterização clínica dos animais

Os animais foram avaliados por dois médicos veterinários e classificados clinicamente conforme as formas polares da doença: **assintomáticos**, sem nenhum sinal sugestivo da LVC, e **sintomáticos**, presença de pelo menos um sinal sugestivo.

3.4 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo cães nativos (com ou sem raça definida) e cães sentinelas (da raça Beagle) com idade acima de 4 meses, de ambos os sexos. Os cães nativos foram selecionados a partir de proprietários das áreas urbana e rural do município, com preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os cães sentinelas foram introduzidos na área de estudo, após esquema vacinal completo (3 doses de leish-Tec[®] com intervalo de 21 dias entre cada dose), que foi realizado em área não-endêmica, no distrito de Macacos, município de Nova Lima/MG. Os cães sentinelas foram adquiridos de criadores comerciais de área não endêmica para LVC, procedentes do Sul do país.

3.5 Desenho do estudo

Estudo clínico randomizado, mascarado e controlado por placebo, realizado com uma população de 1.522 cães nativos do município de Porteirinha, Norte de Minas Gerais e em 154 cães sentinelas da raça Beagle, totalizando 1.676 animais.

Os cães nativos foram mantidos com seus proprietários sendo alocados em blocos aleatórios para receber vacina ou placebo. Os cães da raça beagle - sentinelas foram domiciliados na área do ensaio clínico e foram alocados da mesma forma que os cães nativos.

A amostra do ensaio clínico foi constituída de dois grupos de 761 cães nativos e 77 cães sentinelas cada um. Um dos grupos recebeu a vacina Leish-Tec[®], o outro grupo recebeu placebo. A alocação de todos os cães da amostra em blocos aleatórios garantiu o mascaramento durante a execução do estudo, não permitindo a distinção do cão que recebeu a vacina Leish-Tec[®], do cão que recebeu placebo. Esta identificação foi feita apenas ao final do ensaio, com a quebra de códigos após a definição de casos.

As doses de vacina Leish-Tec[®] utilizadas no estudo foram produzidas pelo laboratório Hertape Saúde Animal (Juatuba, Minas Gerais, Brasil) e padronizadas para conter 100 µg/mL de proteína recombinante A2 e 500µg/mL de saponina como adjuvante. Solução salina tamponada (pH 7.4) foi utilizada como placebo. O regime de vacinação consistiu de 3 doses de 1mL de vacina, aplicada por via subcutânea, em intervalos de 21 dias (Fernandes et al., 2008). As doses de placebo e vacina foram codificadas, utilizando quatro letras, no laboratório Hertape, tinham a mesma aparência externa e foram aplicadas de forma cega por veterinários de campo que desconheciam seu conteúdo.

3.5.1 Determinação da taxa de infecção vetorial

Para avaliar a transmissão das leishmanias dos cães infectados para os vetores e para cumprir com os requisitos estatísticos mínimos para estimar a diferença na proporção da transmissão entre cães vacinados e não vacinados, infectados naturalmente, foi calculada uma amostra inicial de pelo menos 77 cães em cada grupo, total de 154 animais. Os cães incluídos no ensaio de infectividade foram selecionados de forma mascarada a partir da inclusão na análise dos blocos que apresentassem pelo menos dois cães infectados.

Este cálculo se baseou nas seguintes premissas:

- a) Nível de significado estatístico ($\alpha=0,05$);
- b) Poder do teste ($1-\beta=0,90$);
- c) Prova de hipótese bidirecional (ou bicaudal);
- d) Proporção da infecção de vetores por leishmanias presentes em cães não vacinados infectados estimada em 50% (baseado em da Costa-Val *et al.*, 2007);
- e) Uma diferença esperada entre os grupos de 50%;
- f) Perda de 10% da amostra.

O cálculo da amostra foi baseado em Fleiss (1981)

$$n = \frac{n'}{4 * [1 + \frac{1}{1 + 2(c+1)/(n'c | p_2 - p_1 |)}]^2}$$

com

$$n' = \frac{[Z(1-\alpha/2)^2(c+1)p(1-p) + Z(1-\beta)^2 c * p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)]^2}{c * (p_2 - p_1)^2}$$

onde,

$$p = (p_1 + cp_2)/(1+c)$$

p_1 : incidência no grupo 1

p_2 : incidência no grupo 2

c : razão entre grupo 1 e grupo 2

$Z \alpha$: risco do erro alfa

$Z (1-\beta)$: poder desejado

3.6 Obtenção de flebotomíneos

Os flebotomíneos utilizados na técnica de xenodiagnóstico pertenciam à primeira geração (F1) de *L. longipalpis* capturados na Gruta da Lapinha, município de Lagoa Santa, Minas Gerais, situada a 49 km de Belo Horizonte. Estes foram levados ao Centro de Controle de Zoonoses de Porteirinha em gaiolas de voil com umidade controlada. Após o repasto sanguíneo nos cães, os flebotomíneos foram transportados de volta a Belo Horizonte para o Laboratório de Leishmanioses do CPqRR.

3.6.1 Xenodiagnóstico

Todos os cães do estudo foram submetidos à técnica de xenodiagnóstico para verificar se houve transmissão de *Leishmania* spp. do cão para o vetor, durante o repasto sanguíneo. Esse parâmetro foi definido como infecciosidade. O xenodiagnóstico foi realizado com flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* da primeira geração (F1) da colônia mantida no Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ.

Trinta fêmeas e cinco machos de *L. longipalpis* foram inseridos em pequenas caixas com uma das extremidades revestida por uma malha fina de nylon. Essa extremidade foi colocada em contato com a pele (face interna do pavilhão auricular) dos cães selecionados, que foram previamente submetidos à anestesia dissociativa com cloridrato de quetamina (Vetanarcol[®]) dose de 3 a 5 mg/Kg IM, cloridrato de xilazina (Dopaser[®]) dose de 1,1 a 2,2 mg/Kg IM e diazepam 0,25 a 0,5 mg/Kg IM. A caixa foi coberta por tecido preto para criar condições adequadas de alimentação. Após aproximadamente 40 minutos de repasto as fêmeas alimentadas foram transferidas para potes com fundo de gesso e algodão úmido (manutenção da umidade), mel (para alimentação) e colocadas em estufa incubadora com temperatura entre 24 e 25°C e umidade de 90%. No quinto dia após a alimentação as fêmeas vivas foram separadas, congeladas e encaminhadas para a etapa de extração de DNA.

A taxa mínima de infecção foi determinada pela técnica de PCR kDNA específica para o gênero *Leishmania* (Degraive et al., 1994). Para garantir o desafio natural o xenodiagnóstico foi realizado nos sub-lotes que apresentavam cães com sorologia positiva. Cada sub-lote era composto por dois cães vacinados e dois placebos. Isto permitiu que o xenodiagnóstico fosse realizado também de forma mascarada.

3.7 Exames sorológicos

As técnicas sorológicas ELISA, RIFI e Kalazar Detect™ (KD) foram realizadas no Laboratório de Doenças Parasitárias da UFOP. A primeira sorologia (censo canino) foi realizada em amostra de sangue dessecado em papel de filtro, coletado em ponta de orelha. As demais sorologias foram realizadas em soro separado à partir de sangue periférico coletado em carótida externa ou cefálica.

O ELISA e a RIFI foram realizados conforme manual do respectivo kit da Biomanguinhos/Fiocruz. O teste rápido Kalazar Detect™ foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante: Inbios Inc., <http://www.inbios.com/products.php?code=vetControlsCanine> (“Canine Visceral Leishmaniasis Dipstick”, número de catálogo INA015). A positividade das reações foi determinada como indicado na bula dos respectivos kits.

Anticorpos anti-proteína A2 foram dosados nos cães nativos e sentinelas nos Tempos 0 e 73 do ensaio. Essa técnica foi realizada no Laboratório da Faculdade de Farmácia da UFMG. A medida da resposta sorológica anti-A2 pelo método ELISA foi realizada utilizando a proteína recombinante A2 purificada, preparada como previamente descrito (Fernandes et al., 2008).

3.8 Coleta de amostras biológicas e eutanásia dos cães

Após a avaliação clínica, que classificou os cães em assintomáticos ou sintomáticos, foi coletada uma amostra de 5ml de sangue periférico, por punção das veias cefálica ou jugular, em tubos para coleta de sangue sem anticoagulante, para separação do soro.

Os animais foram submetidos à punção de medula óssea realizada na epífise tibial, em estado de anestesia geral com tiopental sódico (Tiopentax® - Cristália) na dose de 5-15 mg por kg/ PV pela via endovenosa. Em seguida foi realizada tricotomia e assepsia com álcool 70% e a medula óssea foi aspirada utilizando-se agulha 40x12 e seringa de 20 ml estéril descartável. Uma parte da medula aspirada foi utilizada para preparar esfregaços corados com Giemsa e examinados ao microscópio óptico para a identificação de formas amastigotas de *Leishmania*. A outra parte foi inoculada em meio NNN/LIT para isolamento do parasito.

A eutanásia dos cães soropositivos foi realizada utilizando-se sobredose de thionembital (Tiopentax® - Cristália), via endovenosa, na dose de 15mg/kg PV e, logo após plano anestésico profundo, injeção de 20ml de solução de cloreto de potássio saturada (20% de cloreto de potássio em água bidestilada), via endovenosa (Resolução 714/2002 do CFMV). Uma vez atestado o óbito do animal foi realizada incisão no flanco esquerdo, em decúbito lateral direito, para exposição dos intestinos, para coleta de fragmentos de linfonodo mesentérico e baço. Da borda distal da orelha também foi retirado fragmento. Amostras de

baço, linfonodo mesentérico e pele foram utilizadas em exame parasitológico direto e imunohistoquímica. A carcaça do animal foi acondicionada em saco plástico e destinada ao aterro sanitário do município. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP. (anexo III).

3.9 Exames moleculares

3.9.1 *Extração de DNA*

A extração de DNA das amostras de tecidos dos cães e de flebotomíneos foi realizada utilizando-se o kit comercial *illustra™ Tissue and Cells genomic Prep Mini Spin* - GE Healthcare, de acordo com o protocolo que acompanha o kit:

| |
|---|
| <p>1. Homogeneização:</p> <p>Separar 50µg de tecido animal ou <i>pool</i> de flebotomíneos em microtubo de 2ml, adicionar 1ml de PBS, centrifugar por 2 minutos a 13.000rpm. Descartar o sobrenadante.</p> |
| <p>2. Lise:</p> <p>Adicionar 50µl de tampão de lise, 10µl de proteinase K pré-diluída a 20mg/ml, passar o tubo no vortex. Incubar por 1 hora a 56°C e passar novamente no vortex.</p> |
| <p>3. Purificação:</p> <p>Adicionar 500µl de tampão de lise e passar no vortex. Descansar por 10 minutos a temperatura ambiente. Transferir o conteúdo para a coluna, centrifugar por 1 minuto a 10.000rpm. Descartar o filtrado.</p> |
| <p>4. Lavagem e secagem:</p> <p>Adicionar 500µl de tampão de lise, centrifugar por 1 minuto a 10.000rpm. Descartar o filtrado. Adicionar 500µl do tampão de lavagem, centrifugar por 3 minutos a 10.000rpm. Descartar o filtrado e o tubo de coleta.</p> |
| <p>5. Eluição:</p> <p>Transferir a coluna para um microtubo novo de 2ml. Adicionar 200µl de tampão de eluição pré-aquecido a 70°C, descansar por 1 minuto a temperatura ambiente, centrifugar por 1 minuto a 10.000rpm. Descartar a coluna e estocar o DNA purificado (filtrado) a -20°C.</p> |

3.9.2 *Reação em cadeia da polimerase - PCR*

O par de iniciadores utilizado foi previamente desenhado para o gênero *Leishmania*, a partir da região conservada do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) do parasito. Os iniciadores A: 5' (C/G) (C/G) (G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' e

iniciador B: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3' (Degrave et al., 1994) amplificam um segmento de 120 pb do DNA do cinetoplasto.

As reações foram preparadas para um volume final de 50µl contendo 1,0µl de DNA (de 10 a 20 ng de DNA/ µl), 1,0µl (10 pmol) de cada iniciador (Bioneer), 46µl de água ultra-pura (Gibco™) e uma “bead” (Ready-to-go PCR beads - GE Healthcare) contendo, após reconstituição para 50µl, uma concentração de 100 µM de cada dNTP em 5 mM de Tris-HCl (pH 9.0 em temperatura ambiente), 25mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, BSA, aproximadamente 2,5 unidades de DNA polimerase e tampão de reação.

A amplificação foi feita em equipamento termociclador automático (Eppendorf® Mastercycler gradient) utilizando-se o seguinte programa: 94°C por 4 minutos seguidos de 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 60°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 30 segundos para extensão; extensão final a 72°C por dez minutos.

O produto amplificado resultante da PCR kDNA foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 2% submetido a corrente de 110V (Fonte BioRad) imerso em tampão TBE. Foram aplicados no gel 25 µl do produto amplificado misturados a 5 µl de tampão de corrida (Orange). O marcador de peso molecular utilizado foi o 100pb (Invitrogen™). O gel foi visualizado no aparelho ImageQuantLAS4000 – GE Healthcare.

3.10 Cronologia do estudo

Logo abaixo está a descrição dos tempos do estudo e dos exames e procedimentos realizados em cada momento.

Tempo -42 e Tempo -21

Vermifugação /Vacinação Multi-Dog®

Tempo Zero

Avaliação clínica

Exames sorológicos (ELISA e RIFI)

1ª dose vacina ou placebo

Avaliação imunológica (sorologia anti-A2) - 154 cães sentinelas

Tempo 21

Avaliação clínica

2ª dose vacina ou placebo

Tempo 42

Avaliação clínica

3ª dose vacina ou placebo

Tempo 73

Avaliação clínica

Exames sorológicos (ELISA, RIFI e Kalazar Detect)

Avaliação imunológica (sorologia anti-A2) - 154 cães sentinelas

Tempo 102, 132, 192, 222, 282, 312, 372, 407, 467, 557

Avaliação clínica

Tempo 162, 252, 342, 437, 497

Avaliação clínica

Exames sorológicos (ELISA, RIFI, Kalazar Detect)

Eutanásia

Tempo 252: Critério de exclusão – janela imunológica

Avaliação clínica

Exames sorológicos (ELISA, RIFI e Kalazar Detect)

Tempo 407

Avaliação clínica

4ª Dose vacinal (Reforço anual)

Tempo 527: Avaliação Final

Avaliação clínica

Exames sorológicos (ELISA, RIFI e Kalazar Detect)

Eutanásia de todos os cães com sorologia positiva

3.11 Análise estatística

Para comparar o percentual de positividade dos testes (RIFI, ELISA, Xenodiagnóstico, Parasitológico e teste rápido Kalazar detectTM), entre as classificações clínicas “sintomático” e “assintomático”, assim como para comparar o percentual de positividade na técnica de xenodiagnóstico entre os grupos vacinado e placebo foi utilizado o teste Qui-Quadrado (Agresti, 2002).

Para comparar o número de resultados positivos nos 5 testes por cão diagnosticado entre as classificações clínicas, foi utilizado o teste o Mann-Whitney (Hollander & Wolfe, 1999).

O software utilizado na análise foi o R versão 3.0.2.

Resultados

4 Resultados

4.1 Descrição da amostra

A amostra do xenodiagnóstico foi composta por 136 animais cuja relação completa consta no anexo I. Destes, 79(58,1%) eram machos, 57(41,9%) eram fêmeas; 99(72,8%) cães nativos, 37(27,2%) cães beagles/sentinelas; 27(19,1%) possuíam sintomas sugestivos de LVC; 67(49,2%) pertenciam ao grupo vacinado, 69(50,8%) ao grupo que recebeu placebo, 13(9,6%) eram procedentes da zona rural e 123(90,4%) da zona urbana. Considerando o cálculo estatístico, que determinou uma amostra mínima de 77 animais em cada grupo (n=154), vacinado e placebo, concluímos que a perda inicial foi de 11,69%.

Tabela 1: Distribuição da população de estudo segundo sexo, esquema vacinal, clínica, procedência e origem, Porteirinha, 2010.

| | | |
|------------------------|---------------|-------------|
| <i>Sexo</i> | Machos | Fêmeas |
| | 58% | 42% |
| <i>Esquema vacinal</i> | Placebo | Vacina |
| | 51% | 49% |
| <i>Clínica</i> | Assintomático | Sintomático |
| | 81% | 19% |
| <i>Procedência</i> | Rural | Urbana |
| | 10% | 90% |
| <i>Origem</i> | Beagles | Nativos |
| | 27% | 73% |

4.2 Classificação clínica dos cães

Cada um dos cães do estudo foi classificado como: **assintomático** – ausência de quaisquer sintomas sugestivos de LVC; ou **sintomático** – presença de pelo menos um sintoma sugestivo. Dos 136 cães, 109 foram classificados como “assintomáticos” e 27 classificados como “sintomáticos”.

A figura 3 mostra os resultados referentes ao exame clínico dos cães classificados como sintomáticos. O emagrecimento e a dermatite foram os sintomas predominantes, presentes em quase 50% dos animais.

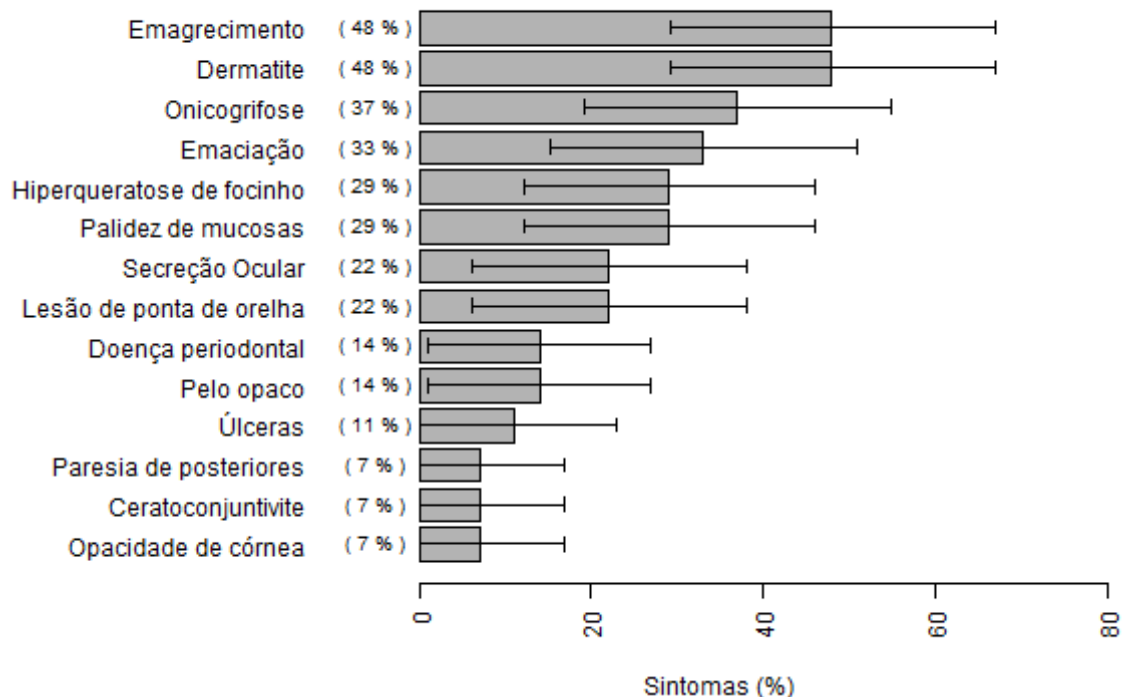


Figura 3: Frequência dos sinais clínicos sugestivos da LVC, no grupo de cães sintomáticos, Porteirinha/MG, 2010.

Os sintomas clínicos identificados nos cães foram organizados em três grandes grupos de alterações (Tabela 2): dermatológicas (referentes à pele e anexos), de escore corporal (desde emagrecimento leve até emaciação) e oculares.

Ao avaliar os intervalos de confiança da tabela 2, pode-se verificar que não existe diferença significativa entre os percentuais de sintomas de pele (88,9%) e de sintomas de escore corporal (77,8%), uma vez que os intervalos se sobrepõem. Porém, as porcentagens de ambos os sintomas são significativamente maiores que a porcentagem de sintomas oculares (33,3%).

Tabela 2: Frequência de alterações sugestivas da LVC, distribuídas por grupo, e seus respectivos intervalos de confiança, Porteirinha/MG, 2010.

| Grupo de sintomas | N=27 | I.C. - 95% |
|-------------------------------|-------------|---------------------|
| Alterações dermatológicas | 24 | 88,9% [77,3; 100,0] |
| Alterações de escore corporal | 21 | 77,8% [62,1; 93,5] |
| Alterações oculares | 9 | 33,3% [15,5; 51,1] |

4.3 Desempenho dos testes por grupo clínico

A figura 4 mostra os resultados do percentual de positividade dos testes RIFI, ELISA, xenodiagnóstico, parasitológico e teste rápido - Kalazar Detect™ entre os grupos clínicos, relativo ao tempo 497 do estudo. Foi encontrada diferença significativa no percentual de positividade entre os grupos para os testes RIFI (p-valor 0,025), xenodiagnóstico (p-valor 0,002) e teste rápido (p-valor 0,000). Para os testes ELISA e parasitológico não houve evidências de diferenças significativas no percentual de positividade dos mesmos entre os grupos clínicos.

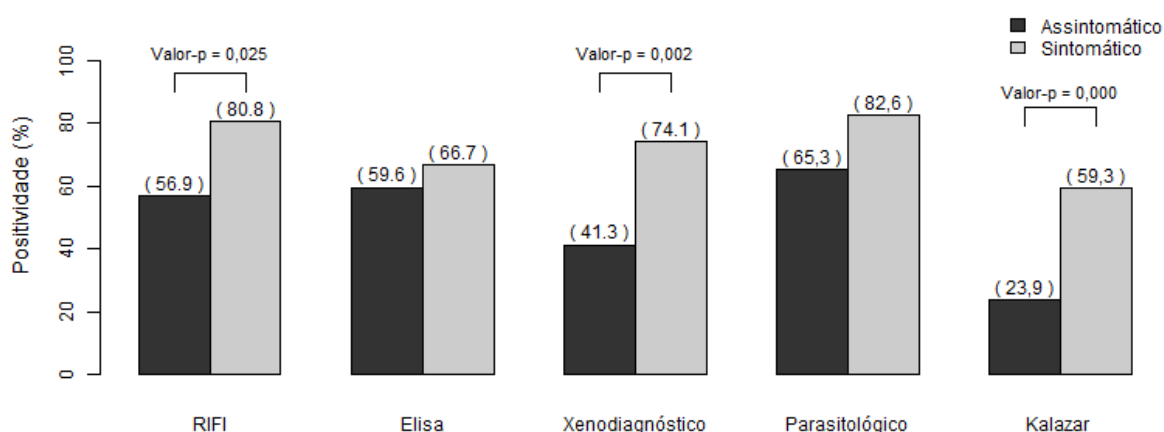


Figura 4: Percentual de positividade dos testes diagnósticos, estratificado por classificação clínica, Porteirinha/MG, 2010.

Uma vez que a amostra de cada grupo clínico, assintomáticos ou sintomáticos, inclui animais que receberam vacina e placebo, consideramos a possibilidade de influência da vacinação no percentual de positividade dos testes diagnósticos. Realizou-se então, uma análise estratificada com o objetivo de verificar um possível viés nos resultados.

As figuras 5 e 6 referem-se às análises de desempenho dos testes, considerando cada grupo separadamente, também relativo ao tempo 497 do estudo. Para os cães que receberam placebo (figura 5), as diferenças entre grupos clínicos se mantiveram para os testes xenodiagnóstico (p-valor 0,008) e teste rápido (p-valor 0,038), mas não para a RIFI.

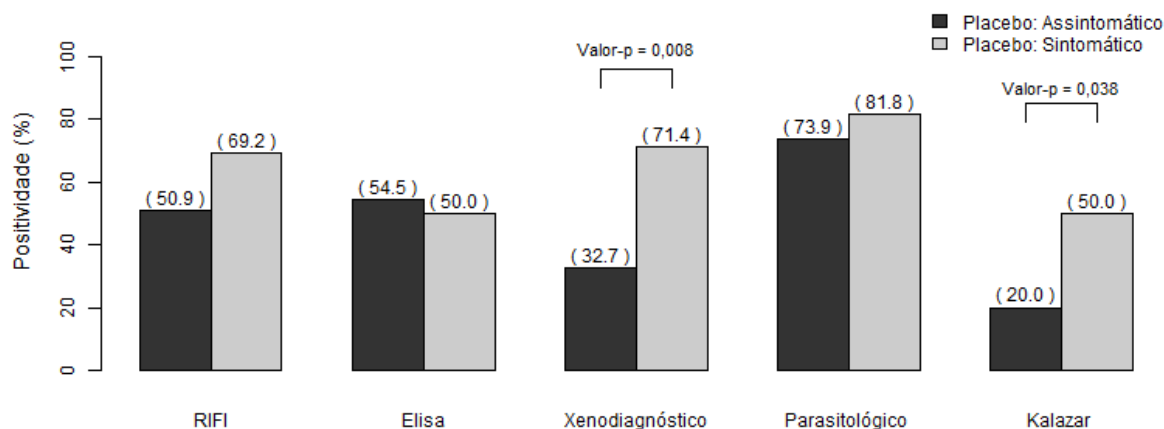


Figura 5: Percentual de positividade dos testes diagnósticos, no grupo placebo, estratificado por classificação clínica, Porteirinha/MG, 2010.

Para o grupo de cães que recebeu vacina (figura 6), as diferenças se mantiveram para os testes RIFI (p-valor 0,049) e teste rápido (p-valor 0,009), mas não para o xenodiagnóstico.

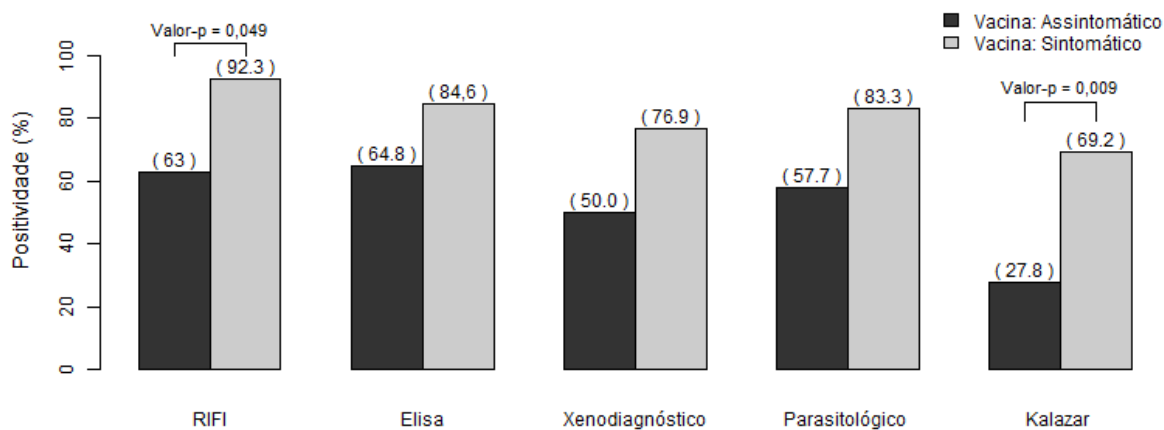


Figura 6: Percentual de positividade dos testes diagnósticos, no grupo vacinado, estratificado por classificação clínica, Porteirinha/MG, 2010.

A tabela 3 e a figura 7 mostram a análise do número de resultados positivos dos testes diagnósticos, por tipo de classificação clínica, relativo ao tempo 497 do estudo. No grupo assintomático, cada cão apresentou em média 2,11 testes positivos, enquanto que no grupo sintomático a média de resultados positivos foi de 3,48. Avaliando as medianas, tem-se que no grupo assintomático, pelo menos 50% dos cães apresentaram 2 testes positivos, enquanto que no grupo sintomático, pelo menos 50% dos cães apresentaram 4 testes positivos, sendo essa diferença significativa (p-valor 0,000).

Tabela 3: Análise do número de resultados positivos dos testes diagnósticos, por tipo de classificação clínica, em cães domiciliados em Porteirinha/MG, 2010.

| | N | Média | D.P. | Mínimo | 1° Q | 2° Q | 3° Q | Máximo | P Valor ¹ |
|----------------|-----|-------|------|--------|------|------|------|--------|----------------------|
| Assintomáticos | 109 | 2,11 | 1,50 | 0 | 1 | 2 | 3 | 5 | 0,000 |
| Sintomáticos | 27 | 3,48 | 1,67 | 1 | 2 | 4 | 5 | 5 | |
| Global | 136 | 2,38 | 1,62 | 0 | 1 | 2 | 4 | 5 | - |

¹Teste Mann-Whitney.

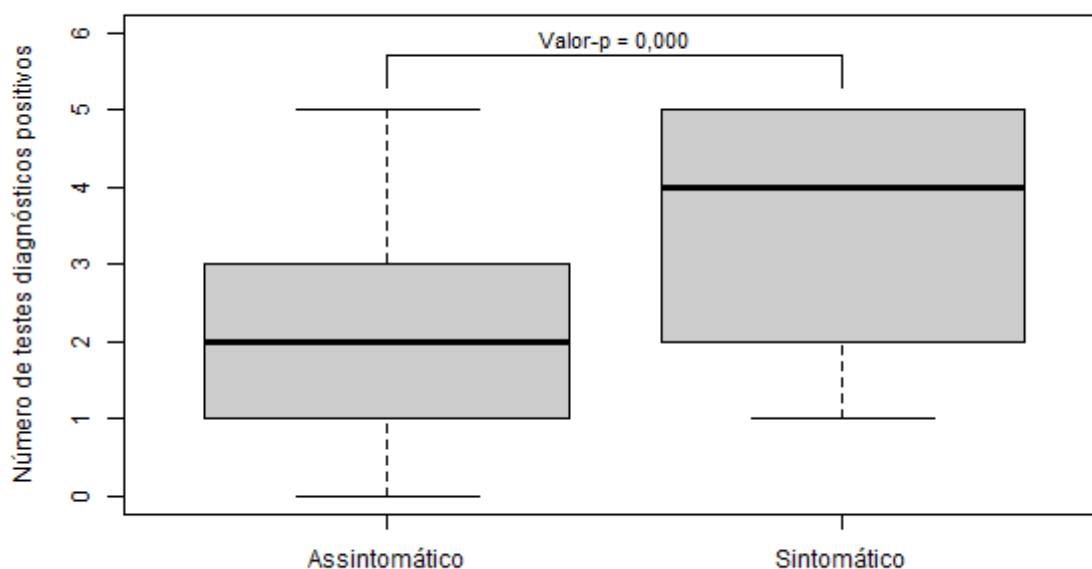


Figura 7: Boxplot da comparação da distribuição de resultados positivos por cão diagnosticado, entre os grupos clínicos sintomático e assintomático, em cães domiciliados em Porteirinha/MG, 2010.

Da mesma forma, realizou-se a análise do número de testes diagnóstico positivos, por classificação clínica, separadamente por grupo vacinado e placebo (Tabela 4 e figura 8A e 8B).

Para o grupo placebo (8A), entre os assintomáticos, cada cão apresentou em média 1,89 testes positivos, enquanto que entre os sintomáticos a média de resultados positivos foi de 3,00. Avaliando as medianas, tem-se que no grupo assintomático, pelo menos 50% dos cães apresentaram 2 testes positivos, enquanto que no grupo sintomático, pelo menos 50% dos cães apresentaram 3 testes positivos, sendo essa diferença significativa (valor-p=0,042).

Para os cães vacinados (8B), entre os assintomáticos, cada cão apresentou em média 2,33 testes positivos, enquanto que entre os sintomáticos, a média de resultados positivos foi de 4,00. Avaliando as medianas, tem-se que no grupo assintomático, pelo menos 50% dos cães apresentaram 2 testes positivos, enquanto que no grupo sintomático, pelo menos 50% dos cães apresentaram 5 testes positivos, sendo essa diferença significativa (valor-p=0,001).

Tabela 4: Análise do número de resultados positivos dos testes diagnósticos, por tipo de classificação clínica, entre os grupos vacinado e placebo, Porteirinha/MG, 2010.

| | | N | Média | D.P. | 1° Q | 2° Q | 3° Q | p-valor¹ |
|----------|---------------|----------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------------------|
| Placebo | Assintomático | 55 | 1,89 | 0,20 | 1 | 2 | 3 | 0,042 |
| | Sintomático | 14 | 3,00 | 0,46 | 1 | 3 | 5 | |
| Vacinado | Assintomático | 54 | 2,33 | 0,21 | 1 | 2 | 3 | 0,001 |
| | Sintomático | 13 | 4,00 | 0,42 | 3 | 5 | 5 | |

¹Teste Mann-Whitney.

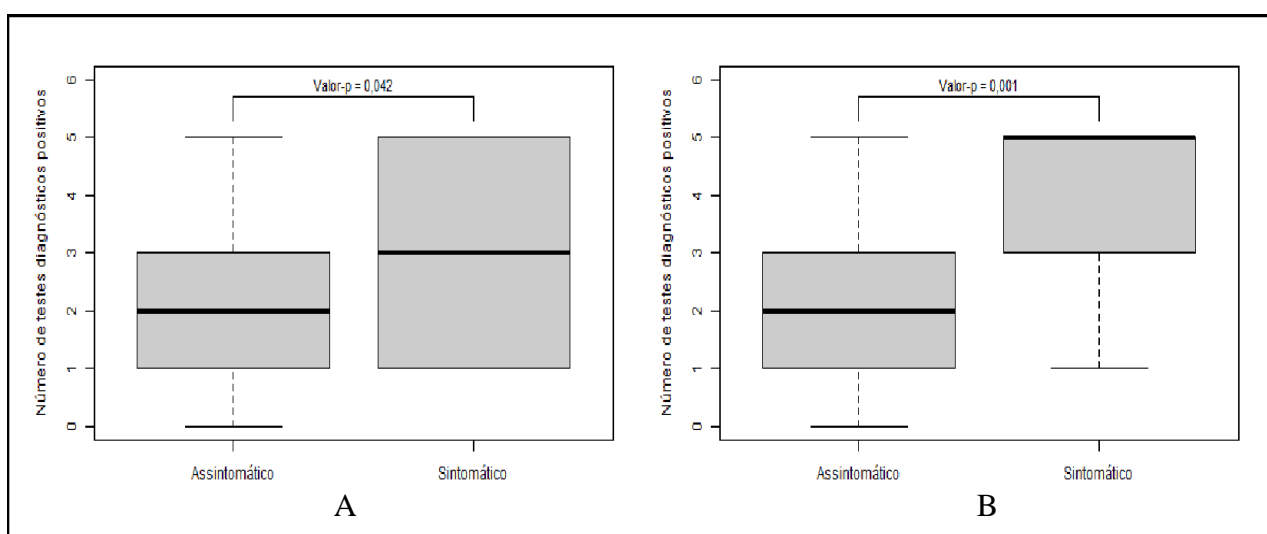


Figura 8: Boxplot da comparação da distribuição de resultados positivos por cão diagnosticado, entre os grupos clínicos sintomático e assintomático, (A) placebo e (B) vacinado, em cães domiciliados em Porteirinha/MG, 2010.

4.4 Infectividade para flebotomíneos - xenodiagnóstico

Dos 136 cães que foram submetidos ao xenodiagnóstico, 65 foram excluídos da análise de infectividade porque soroconverteram antes da janela imunológica (item 6.6).

Na Tabela 5 está apresentada a taxa de transmissibilidade medida pela PCR kDNA de *pool* de flebotomíneos na técnica de xenodiagnóstico. O DNA de *Leishmania* spp. foi detectado em 29 das 71 amostras, correspondendo a uma taxa geral de infectividade de 40,8%. Para o grupo placebo a taxa de infectividade foi de 44,2% (19 de 43 pools). Não houve diferença estatística (p-valor 0,478) na taxa de infectividade no grupo de cães vacinados quando comparado com o grupo de cães placebo. No entanto, uma tendência (p-valor 0,052) de redução na infectividade para flebotomíneos foi observada quando realizada a estratificação dos animais de acordo com a resposta sorológica frente ao antígeno A2. Neste caso, enquanto proporções semelhantes de *pools* negativos (n = 4) e *pools* positivos (n = 4) foram alimentados em cães anti-A2 negativos, somente 4 dos 15 *pools* foram positivos (26,7%), após a alimentação em animais vacinados anti-A2 positivos. Sendo assim, 73,3% dos *pools* de flebotomíneos que se alimentaram em cães anti-A2 positivos permaneceram negativos para *Leishmania* spp., correspondendo a uma taxa de transmissão de 46,6% para os flebotomíneos.

Tabela 5: Frequência dos resultados do xenodiagnóstico realizado em cães que receberam vacina ou placebo, Porteirinha/MG, 2010.

| Grupo | Classificação A2 | PCR kDNA | | Total |
|-------------|------------------|-----------|-----------|-------|
| | | Negativo | Positivo | |
| Placebo | | 24 (55.8) | 19 (44.2) | 43 |
| Vacinado | Positivo | 11 (73.3) | 4 (26.7) | 15 |
| | Negativo | 4 (50.0) | 4 (50.0) | 8 |
| | Não informado | 3 (60.0) | 2 (40.0) | 5 |
| | Total | 18 (64.3) | 10 (35.7) | 28 |
| Total geral | | 42 (59.2) | 29 (40.8) | 71 |

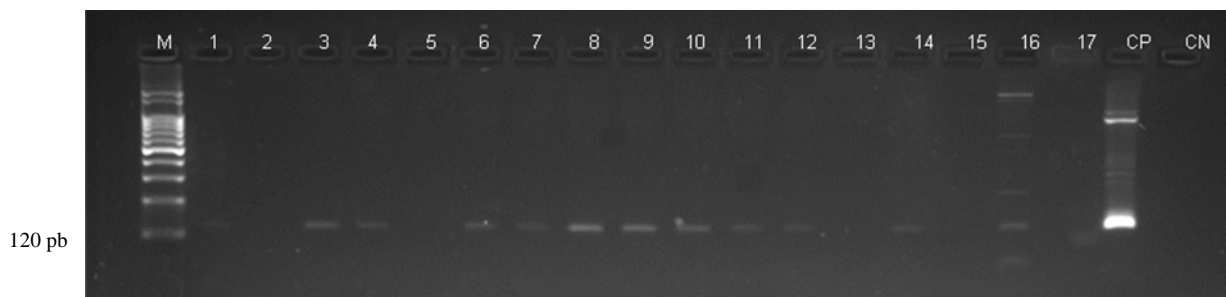
p valor = 0.48 (sem estratificação – placebo x vacinado);

p valor = 0.05 (estratificado – placebo x vacinado positivo para A2)

4.5 Visualização dos resultados da PCR kDNA

A figura 9 mostra os resultados da PCR kDNA em *pools* de flebotomíneos na técnica de xenodiagnóstico. Foram consideradas positivas as amostras presentes nas canaletas 1, 3, 4, 6-12, 14 e 16, que apresentaram fragmento amplificado equivalente a 120 pb, correspondente à cópia-alvo do DNA do cinetoplasto de *Leishmania* spp. As siglas CP e CN referem-se aos controles positivo (DNA de *Leishmania* da cepa MHOM PP75) e negativo (flebotomíneo não alimentado), respectivamente.

Figura 9: Visualização dos resultados da reação de PCR kDNA, em amostras de flebotomíneos (xenodiagnóstico) – gel de agarose 2%.



4.6 Perdas

Dos 136 cães selecionados para a realização da técnica de xenodiagnóstico, 48 soroconverteram no período anterior ao T252, definido como a janela imunológica do estudo. Um cão soroconverteu no T0 (2%), 7 cães no T73 (14,6%), 13 cães no T162 (27,1%) e 27 cães no T252(56,3%). Da amostra inicialmente calculada para a realização do xenodiagnóstico restaram 71 cães para a análise final, correspondendo a uma perda total de 54%.

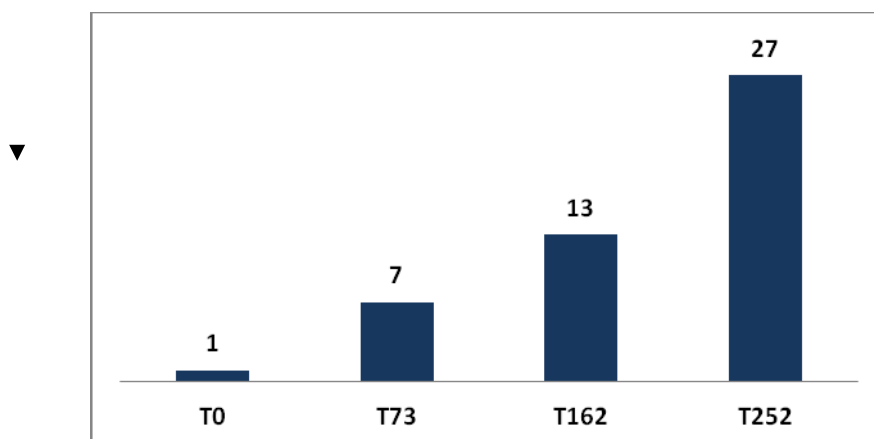


Figura 10: Frequência dos cães que soroconverteram antes da janela imunológica (Tempo 252), e respectivo Tempo, Porteirinha/MG, 2010.

Discussão

5 Discussão

O presente estudo foi realizado na área endêmica de Porteirinha, norte de Minas Gerais, que ficou caracterizada, pela elevada força de infecção e soroprevalência canina, como adequada para a realização do ensaio clínico de fase III para determinação da eficácia da vacina Leish-Tec[®]. O percentual de soropositividade canina encontrado, 23% na zona urbana e 73% na zona rural, no período desse estudo, pode ser considerado elevado quando comparado a período anterior no mesmo município (França-Silva et al., 2005) e a outros municípios no Norte de Minas, como Montes Claros (França-Silva et al., 2003; Michalsky et al. 2007) e Janaúba (Michalsky et al., 2009) e outros municípios do estado (Dias et al., 2011). A ausência de quaisquer ações de controle da doença nos últimos anos pode ser a explicação para essa alta soroprevalência no município, que por sua vez garantiu que os animais vacinados fossem intensamente desafiados durante o período do ensaio.

Com relação ao exame físico da amostra de 136 cães do estudo de infectividade, podemos afirmar que as lesões dermatológicas foram os sintomas predominantes nos cães classificados como sintomáticos, concordando com o trabalho de outros autores (Ciaramella et al., 1997; Solano-Gallego et al., 2011; Verçosa et al., 2008; Baneth et al., 2008) cujos achados também confirmam que as lesões de pele são os sintomas mais comuns da LVC. Para o programa de controle da LVC a predominância de lesões de pele não tem implicação direta, uma vez que a triagem e retirada dos reservatórios infectados é baseada nos resultados de exames sorológicos e não em exame físico/clínico. Já para a medicina veterinária privada esses dados sugerem que todo cão que apresentar alguma dermatopatia deve ser testado para a doença, principalmente se for residente em área endêmica. Entre todos os sintomas identificados nos cães sintomáticos, somente a doença periodontal não é relato comum em estudos da LVC (Paltrinieri et al., 2010), e foi identificada predominantemente nos cães beagles/sentinelas. Infelizmente não foi possível uma investigação mais aprofundada da causa desse sintoma/patologia.

Em nosso trabalho optamos por utilizar uma classificação clínica simplificada do cão infectado, omitindo a forma oligossintomática (Mancianti et al., 1988), devido à subjetividade inerente da definição desta forma. Sendo assim adotamos somente as formas polares da doença, o que está de acordo com a atual recomendação do grupo Europeu *LeishVet*, embora os mesmos utilizem os termos “infectado por *L. infantum* porém saudável”, que equivale ao assintomático e “doente” que equivale ao sintomático.

5.1 Desempenho dos testes diagnósticos por grupo clínico

Os maiores percentuais de positividade dos testes diagnósticos utilizados, encontrados entre os animais classificados como sintomáticos, corroboram com outros trabalhos (Michalsky et al., 2007; Quaresma et al., 2009; Teixeira-Neto et al., 2010; Reis et al., 2011). As evidências demonstram que à medida que aumentam, a carga parasitária, a resposta imune humoral e a sintomatologia aumenta-se também a sensibilidade dos testes (Couternay et al. 2002; Reis et al., 2011). Se considerarmos que a proporção de cães clinicamente doentes (ou sintomáticos) é sempre menor que a de infectados ou soropositivos, e que a sensibilidade dos testes é superior para cães que apresentam sintomas, podemos sugerir então que, com a metodologia atual de diagnóstico da LVC haverá sempre a tendência de permanecer um resíduo de animais infectados, suficiente para manter o ciclo de transmissão (Couternay et al., 2002; Baneth et al., 2008;).

Costa e colaboradores (2013) desenharam um modelo matemático para descrever a dinâmica de transmissão da LVC e, segundo esses autores, um programa contínuo de longo prazo que retirasse com precisão tanto cães assintomáticos como sintomáticos seria eficaz no controle da leishmaniose canina em áreas de transmissão baixa a moderada. No entanto, o sacrifício indiscriminado de cães assintomáticos com diagnóstico falso positivo pode comprometer a eficácia do programa, se são utilizados testes com baixa especificidade, aumentando a chance de gerar indignação na população, e levando a baixa adesão ao programa, além de contribuir para aumento das taxas de reposição canina (Nunes et al., 2008). Para esses autores o diagnóstico deficiente dos cães assintomáticos é uma das causas para a falha dos programas de controle da LVC.

Ainda sobre a limitação dos testes diagnósticos, Peixoto e colaboradores (2015) demonstraram, através de uma meta-análise, que os testes oficiais, ELISA com antígeno bruto e DPP[®], têm precisão moderada para o diagnóstico da LVC. Afirmam ainda que a recomendação para a utilização desses dois testes é baseada em evidências escassas e restritas ao panorama brasileiro. A definição de referência padrão ou padrão-ouro, para o diagnóstico da LVC, é também um importante desafio que continua a afetar os estudos de validação dada as limitações do diagnóstico parasitológico convencional. Em nosso estudo, por exemplo, só foram considerados casos confirmados aqueles que apresentaram pelo menos um exame parasitológico positivo (exame direto em lâmina, mielocultura ou histopatologia). Por fim, a literatura carece de investigação mais aprofundada sobre outros potenciais geradores de heterogeneidade na resposta aos testes, tais como estado de vacinação anti-LVC (Marcondes et al., 2013) ou histórico de migração. Em nosso estudo o *status* do animal, “vacinado” ou “placebo” não interferiu no percentual de positividade dos testes, tanto para assintomáticos

quanto para sintomáticos, porém essa análise não foi realizada na amostra total do ensaio clínico.

Dentre os cinco testes de diagnóstico utilizados, o teste rápido Kalazar Detect[®] foi o único que manteve a diferença significativa de desempenho entre grupos clínicos em todas as análises realizadas: na amostra total, somente no grupo vacinado, somente no grupo placebo. Em um trabalho anterior do nosso grupo, também foi identificada essa diferença no desempenho do teste rápido, em amostras de cães provenientes de três municípios endêmicos em Minas Gerais (Regina-Silva et al., 2014). Grimaldi e colaboradores (2012) encontraram diferença de desempenho do teste rápido DPP[®] entre cães com ou sem sintomas da doença. O teste alcançou alta especificidade (96%), mas baixa sensibilidade (47%) em cães sem sintomas sugestivos da LVC. Já entre os cães clinicamente doentes o teste demonstrou sensibilidade significativamente maior (98%). Tanto o Kalazar Detect[®], quanto o DPP[®], e também o IT-Leish[®] (de Assis et al., 2012), (versão para diagnóstico da leishmaniose visceral humana) parecem diagnosticar melhor a infecção na presença de sintomas clínicos. Um teste rápido multiplex, que utilize múltiplos antígenos selecionados a partir da identificação de biomarcadores do início da infecção canina assintomática poderia ter resultados mais eficazes nos programas de controle (Faria et al., 2015).

Na amostra global do xenodiagnóstico, um percentual de 47,8% dos cães (65/136) foi capaz de transmitir o parasito ao vetor. Dentre estes, os cães sintomáticos foram mais eficazes na transmissão do parasito ($p < 0,05$), concordando com outros autores (Travi et al., 2001; Courtenay et al., 2002; Michalsky et al., 2007; da Costa-Val et al., 2007; Soares et al., 2011) se realizada uma análise geral. Essa diferença estatística se manteve no grupo placebo, mas não no grupo vacinado, quando realizada análise estratificada. Sendo assim, a transmissão de *Leishmania* spp. para o vetor, em cães vacinados infectados foi igual, entre aqueles que apresentaram ou não sintomas da doença. Esses resultados sugerem que os cães que podem representar o maior risco de transmissão do parasito para flebotomíneos são os sintomáticos, corroborando com outros estudos com *L. longipalpis*, *L. youngi* e *Phlebotomus perniciosus* (Travi et al., 2001; Guarga et al., 2000; Michalsky et al., 2007).

Essa diferença encontrada no desempenho dos testes entre grupos clínicos indica uma limitação no delineamento de estudos de vacina e tratamento da LVC, já que a precisão do diagnóstico interfere diretamente nos resultados e conclusões. Em nosso estudo a utilização de testes em paralelo teve como objetivo minimizar um possível viés, uma vez que não existe um único teste com sensibilidade e especificidade adequados. Esses resultados apontam para a

necessidade de melhoria dos testes diagnósticos, principalmente na detecção da infecção assintomática.

5.2 Xenodiagnóstico e infectividade

O xenodiagnóstico não pode ser utilizado como técnica de rotina, uma vez que requer uma grande quantidade de flebotomíneos produzidos em uma colônia bem estabelecida. No entanto, ele é fundamental para responder a certas questões epidemiológicas, especialmente as relacionadas com infectividade após tratamento ou vacina anti-LVC (Gradoni, 2002). Sendo assim, mesmo não sendo uma técnica simples, o xenodiagnóstico ainda é a ferramenta mais acurada para avaliar a infectividade de cães para o vetor competente, quer seja para avaliar a eficácia de um protocolo de tratamento (Ribeiro et al, 2008;. Miret et al, 2008; da Silva et al, 2012) ou vacina anti-LVC (Bongiorno et al., 2013; Fernandes et al., 2014; Oliva et al., 2014). Uma redução da infectividade para o vetor, em resposta a um esquema de tratamento ou de vacinação anti-LVC é um ponto chave a ser considerado nos programas de controle da doença (Dye, 1996; Romero e Boelaert, 2010; da Silva et al, 2012). Especificamente com relação às vacinas anti-LVC, é fundamental que tenham a capacidade de reduzir ou prevenir a transmissão do parasito para o vetor, para que seu uso possa ser cogitado como uma estratégia coletiva de controle da doença.

Utilizando xenodiagnóstico para avaliar o grau de infecciosidade de cães naturalmente infectados com *L. infantum*, Travi et al.(2001) demonstraram que os indivíduos assintomáticos foram incapazes de infectar as fêmeas de *L. longipalpis*, enquanto que animais oligossintomáticos foram infectivos em taxas muito baixas. Por outro lado, animais sintomáticos foram capazes de infectar um grande número de fêmeas a uma intensidade muito elevada. Esses autores também mostraram que a pele da orelha parece ser mais fortemente parasitada do que a do abdomen.

Courtenay et al. (2002) demonstraram que os cães se tornam infectantes para *L. longipalpis* somente depois que anticorpos séricos contra o parasito podem ser detectados e sugeriram que os títulos de anticorpos poderiam ser utilizados como um fator preditor da infectividade.

Em um estudo europeu, Bongiorno e colaboradores (2013) demonstraram que não há redução da infectividade entre cães vacinados com CaniLeish[®](Virbac). Contudo, eles demonstraram uma redução significativa no número de flebotomíneos infectados por animal e na intensidade de infecção em cada flebotomíneo, no grupo de cães vacinados. Fernandes e colaboradores (2014) encontraram valores semelhantes de infectividade em cães vacinados com Leish-Tec[®] (5.1%) e Leishmune[®] (5.4%), com redução significativa da infectividade

quando comparado ao grupo placebo (36.6%). Em nosso trabalho a taxa de infectividade foi de 35,7% no grupo vacinado e 44,2% no grupo placebo, sem diferença entre os grupos. Esses são os dois únicos trabalhos, até o momento, que avaliaram a infectividade, através de xenodiagnóstico direto, em cães vacinados e desafiados naturalmente, o que torna a discussão e comparação de resultados bastante limitada. As diferenças encontradas entre o nosso trabalho e o de Fernandes, com relação à infectividade, possam talvez ser atribuídas ao alvo utilizado na PCR, a intensidade do desafio natural (prevalência média de 34% em nosso trabalho) e o tempo de exposição à infecção (18 meses *versus* 11 meses).

Embora a amostra final de cães atenda as análises estatísticas do estudo, inicialmente um número bem maior de animais foi planejado para melhor atender os pré-requisitos estatísticos. A amostra inicialmente calculada foi de 77 cães por grupo vacinado e placebo, tendo sido estimada para uma perda total de 10%. Infelizmente o estudo finalizou com apenas 71 cães ao invés de 154, com perda real maior que 54%. Essas perdas ocorreram não só pela exclusão de cães que soroconverteram antes da janela imunológica de 252 dias, como também por recusa de proprietários em entregar os animais soropositivos e outros eventos como fuga do animal ou mudança do dono para outra cidade.

Baseado em nossos resultados cães vacinados com Leish-Tec[®] e desafiados em área endêmica podem infectar o vetor, sendo assim esse potencial infectivo deve ser informado aos proprietários de cães que buscam a vacinação como medida preventiva na rotina dos serviços veterinários privados, pois esses animais, ainda que protegidos das formas clínicas e mais graves da doença pela imunoprofilaxia com Leish-Tec[®] (Fernandes et al., 2008, Fernandes et al., 2014), podem comportar-se como reservatório do parasito e ser fonte de infecção para o vetor. Há necessidade de se utilizar medidas protetivas individuais, como coleiras impregnadas com inseticida, além da vacinação com Leish-Tec[®], para complementar a prevenção da doença. As medidas clássicas de controle, como eutanásia de cães soropositivos e controle vetorial em áreas endêmicas continuam sendo a principal estratégia pública e coletiva de enfrentamento da LVC.

Esse estudo pode ser considerado pioneiro, sendo assim não é possível responder conclusivamente qual seria o impacto da vacinação em massa na redução da transmissão do parasito.

5.3 Limitações do estudo

Os resultados do xenodiagnóstico podem ser influenciados pelo método usado para detectar a infecção, PCR ou dissecação, e pelo número de flebotomíneos utilizados por animal. Quanto maior o número de fêmeas utilizadas por cão, maiores as chances de um

repasto bem sucedido. A dissecação é o método clássico de escolha, uma vez que a visualização do parasito não deixa dúvidas quanto à infecção, porém é menos sensível, extremamente laboriosa e difícil de ser aplicada em amostras grandes. Já a PCR é mais sensível (Soares et al., 2011), permite automatização das análises e a aplicação em amostras grandes. Por essas características, foi o método escolhido para ser utilizado no presente trabalho.

Para a realização do xenodiagnóstico foram utilizadas mais de 8.000 fêmeas de flebotomíneos alimentadas em 136 animais, a maior amostra já estudada com esse método (Molina et al., 1994; Guarga et al., 2000; Travi et al., 2001; Courtenay et al., 2002; Michalsky et al., 2007; da Costa-Val et al., 2007; Verçosa et al., 2008, Ribeiro et al., 2008; Miret et al., 2008; Amorim et al., 2011; Soares et al., 2011; da Silva et al., 2012; Bongiorno et al., 2013; Laurenti et al., 2013; Fernandes et al., 2014).

Limitações logísticas (Porteirinha fica a 640 km ao norte de Belo Horizonte) determinaram uma perda de aproximadamente 50% dos flebotomíneos durante o transporte de ida até a área de estudo. Essa perda já havia sido estimada e não influenciou as análises estatísticas, porém é um indicativo de que o transporte pode afetar a viabilidade dos insetos. Portanto não foi possível concluir precisamente se o transporte pós-repasto pode ou não ter influenciado os resultados da infectividade.

Para finalizar, algumas das possíveis limitações do estudo devem ser mencionadas. A possibilidade de viés merece atenção especial. Somente animais com confirmação parasitológica da infecção (mielocultura, imprint/esfregaço e imunohistoquímica) foram considerados como "casos confirmados" e foram incluídos na análise, devido ao nível de precisão adotada no estudo. O baixo valor preditivo positivo dos testes diagnósticos sorológicos tornou difícil a confirmação dos cães como verdadeiros positivos. Infecções causadas por *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Neospora caninum*, ou *Trypanosoma* spp. são algumas das possíveis reações cruzadas em testes sorológicos (Rosário et al., 2005; Day, 2007; Marcondes et al., 2013; Zanette et al., 2014). Além disso, sabe-se que os cães com resultados indeterminados ou mesmo negativos podem mudar o seu estado sorológico para positivo ao longo do tempo. A situação oposta também pode ocorrer; cães assintomáticos com sorologia positiva pode reverter a negativa (Zanette et al., 2014).

As perdas também constituíram uma limitação importante. A amostra final para o cálculo eficácia sofreu perdas superiores a 50%, percentual muito maior do que os 20% inicialmente esperados. Além disso, a partir da primeira sorologia e durante o período da janela imunológica, a prevalência estimada da LVC foi maior do que o esperado, uma vez que o município não realizou quaisquer atividades de controle durante os quatro anos antes do

ensaio. Após a janela imunológica, outros fatores contribuíram para perdas, principalmente devido a eventos comuns em uma população canina, como morte devido a acidentes ou outras infecções. No entanto, o viés de seleção foi minimizado, pois nossos dados indicam que não houve diferença de perdas entre os grupos vacinados e placebo. Para melhor avaliar um possível viés relacionado a perdas, tendo em vista a heterogeneidade da prevalência da LVC na área de estudo, foi necessário demonstrar a distribuição espacial dos grupos vacinados e placebo, estratificando-os de acordo com os cães nativos e beagles. Concluiu-se então que, não houve diferença significativa na distribuição de vacinação (vacina / placebo) em cães nativos, por quadra.

Conclusões

6 Conclusões

Cães vacinados com Leish-Tec[®] transmitem o parasito *Leishmania* spp. tanto quanto cães que receberam placebo, após desafio natural.

Cães vacinados com Leish-Tec[®] e que apresentaram resposta positiva frente ao antígeno A2 esboçaram uma tendência de redução da infectividade (p valor = 0,052) em relação ao grupo placebo.

Os testes diagnósticos RIFI, Xenodiagnóstico e Kalazar Detect[™] demonstraram desempenho significativamente diferente entre cães sintomáticos e assintomáticos, considerando a amostra total de cães. Para o grupo de cães vacinados as diferenças investigadas se mantiveram para os testes RIFI e teste rápido Kalazar Detect[™], mas não para o xenodiagnóstico. Para os cães que receberam placebo as diferenças se mantiveram para os testes xenodiagnóstico e teste rápido Kalazar Detect[™], mas não para a RIFI.

Na análise do número de testes positivos por cão avaliado ficou demonstrado que os animais classificados como sintomáticos apresentam número maior de testes positivos em relação aos assintomáticos, sendo essa diferença significativa para a amostra total de cães, para o grupo vacinado e para o grupo placebo.

O percentual de positividade dos testes é igual, entre cães que receberam vacina ou placebo, tanto para os cães assintomáticos quanto para os sintomáticos, ou seja, a vacinação não interferiu no desempenho dos testes.

Referências bibliográficas

7 Referências bibliográficas

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7(5):e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
- Amorim IF, Silva SM, Figueiredo MM, Moura EP, Castro RS, Lima TK, Gontijo Nde F, Michalick MS, Gollob KJ, Tafuri WL. Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis. PLoS One. 2011;6(11):e27679.
- Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clin Dermatol. 1996; 14(5):523-32.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol. 2000;30:1269-81.
- Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David JR, Reed SG. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. J Infect Dis. 1996;173(3):758-61.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends Parasitol. 2008 Jul;24(7):324-30.
- Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. Parasite Immunol. 2006;28(7):329-37.
- Boaventura VS, Café V, Costa J, Oliveira F, Bafica A, Rosato A, de Freitas LAR, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A. Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2006;75(2):267-9.
- Bongiorno G, Papparcone R, Foglia Manzillo V, Oliva G, Cuisinier AM, Gradoni L. Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish[®]) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs--a preliminary xenodiagnosis study. Vet Parasitol. 2013 Nov 8;197(3-4):691-5.
- Braga MD, Coêlho IC, Pompeu MM, Evans TG, MacAullife IT, Teixeira MJ, Lima JW. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. Rev Soc Bras Med Trop. 1998;31(5):419-24.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf
- Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Vet Rec. 1997 Nov 22;141(21):539-43.

Coelho EA, Tavares CA, Carvalho FA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC, Charest H, Matlashewski G, Gazzinelli RT, Fernandes AP. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun*. 2003 Jul;71(7):3988-94.

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

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis*. 2002 Nov 1;186(9):1314-20.

Coutinho MTZ, Bueno LL, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, Genaro O, Linardi P M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2005;128(1-2):149-55.

Coutinho MTZ, Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet Parasitol*. 2007;147:320-325.

da Costa CA, Genaro O, de Lana M, Magalhães PA, Dias M, Michalick MS, Melo MN, da Costa RT, Magalhães-Rocha NM, Mayrink W. Canine visceral leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1991 Jan-Mar;24(1):21-5.

da Costa-Val AP, Cavalcanti RR, Gontijo NF, Michalick MSM, Alexander B, Williams P, Melo MN. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *The Vet Journal*. 2007 174:636–643.

da Silva SM, Amorim IF, Ribeiro RR, Azevedo EG, Demicheli C, Melo MN, Tafuri WL, Gontijo NF, Michalick MS, Frézard F. Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jun;56(6):2858-67.

de Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MS. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol*. 2002 Oct 16;109(1-2):19-27.

Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 1956.

Dias ES, Regina-Silva S, França-Silva JC, Paz GF, Michalsky EM, Araújo SC, Valadão JL, de Oliveira Lara-Silva F, de Oliveira FS, Pacheco RS, Fortes-Dias CL. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol*. 2011 Mar 10;176(2-3):101-11.

Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchoff LV, Jackson JE, Rowton ED, Schantz PM. Canine visceral leishmaniasis: United States and Canada, 2000–2003. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:440–6.

Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 Aug;55(2):125-30.

Faria AR, de Castro Veloso L, Coura-Vital W, Reis AB, Damasceno LM, Gazzinelli RT, Andrade HM. Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum*-Infected Dogs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Jan 8;9(1):e3429.

Fernandes AP, Costa MM, Coelho EA, Michalick MS, de Freitas E, Melo MN, Luiz Tafuri W, Resende Dde M, Hermont V, Abrantes Cde F, Gazzinelli RT Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine.* 2008 Oct 29;26(46):5888-95.

Fernandes CB, Junior JT, de Jesus C, Souza BM, Larangeira DF, Fraga DB, Tavares Veras PS, Barrouin-Melo SM. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. *Vaccine.* 2014 Mar 5;32(11):1287-95

França-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, da Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2003 Feb 13;111(2-3):161-73.

França-Silva JC, Barata RA, Costa RT, Monteiro EM, Machado-Coelho GL, Vieira EP, Prata A, Mayrink W, Nascimento E, Fortes-Dias CL, da Silva JC, Dias ES. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol.* 2005 Aug 10;131(3-4):213-20.

Ferroglio E, Romano A, Trisciuglio A, Poggi M, Ghiggi E, Sacchi P, Biglino A. Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100(7):636-41.

Gaeta GB, Gradoni L, Gramiccia M, di Martino L, Pizzuti R, Pempinello R, Scotti S, Maisto A. Visceral leishmaniasis in Italy. Its epidemiology, clinical picture and therapy. *Recenti Prog Med.* 1994 Jun;85(6):340-7. Review.

Genaro O. Leishmaniose visceral canina experimental [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas;1993.

Ghosh A, Labrecque S, Matlashewski G. Protection against *Leishmania donovani* infection by DNA vaccination: increased DNA vaccination efficiency through inhibiting the cellular p53 response. *Vaccine.* 2001 Apr 30;19(23-24):3169-78.

Ghosh A, Zhang WW, Matlashewski G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine.* 2001 Oct 12;20(1-2):59-66.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol.* 2006;135(2-3):100-7.

- Grimaldi G Jr, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto Id, de-Azevedo CT, Falqueto A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012 Jan;106(1):54-9.
- Grimaldi G Jr, Teva A, Porrozzi R, Pinto MA, Marchevsky RS, Rocha MG, Dutra MS, Bruña-Romero O, Fernandes AP, Gazzinelli RT. Clinical and parasitological protection in a *Leishmania infantum*-macaque model vaccinated with adenovirus and the recombinant A2 antigen. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Jun 19;8(6):e2853.
- Guarga JL, Lucientes J, Peribáñez MA, Molina R, Gracia MJ, Castillo JA. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Trop.* 2000 Nov 2;77(2):203-7.
- Hernández D, Rojas E, Scorza JV, Jorquera A. Dog (*Canis familiaris*) infectivity to *Lutzomyia youngi* in Trujillo, Venezuela. *Biomedica.* 2006 Oct;26 Suppl 1:242-8.
- Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc.* 1999;35(5):376-83.
- Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(8):811-27.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*; London, Academic Press. 1987; 1-20.
- Lainson R, Shaw JJ. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* (Cunha and Chagas) in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). *Ann Parasitol Hum Comp.* 1988;63(2):134-45.
- Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VL, Tomokane TY, Corbett CE, Secundino NF, Pimenta PF, Marcondes M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol.* 2013 Sep 23;196(3-4):296-300.
- Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD, Mylonakis ME. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically health dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet Parasitol.* 2002;109: 19-27.
- Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J.* 2009;179(1):142-4.
- Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(4):566-7.

Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Della Morte R, Gringoli G, Staiano N, Gravino AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2004;125:251-62.

Marcondes M, de Lima VM, de Araújo Mde F, Hiramoto RM, Tolezano JE, Vieira RF, Biondo AW. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. *Vet Parasitol.* 2013 Nov 8;197(3-4):649-52.

Martinez E, Mollinedo S, Torrez M, Muñoz M, Bañuls AL, Le Pont F. Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum/L. chagasi* in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96(5):529-32.

Marzochi MC, Coutinho SG, De Souza WJ, De Toledo LM, Grimaldi Júnior G, Momen H, Pacheco Rda S, Sabroza PC, De Souza MA, Rangel Júnior FB, et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1985 Jul-Sep;80(3):349-57.

Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today.* 2000;16:188-9.

Meinecke CK, Schottelius J, Oskam L, Fleischer B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics.* 1999;104(5):65.

Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, dos Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Fortes-Dias CL, Dias ES. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol.* 2007;147(1-2):67-76.

Michalsky EM, França-Silva JC, Barata RA, Lara e Silva Fde O, Loureiro AM, Fortes-Dias CL, Dias ES. Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Feb;104(1):56-61.

Miranda S, Roura X, Picado A, Ferrer L, Ramis A. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Res Vet Sci.* 2008;85(1):35-8.

Mizbani A, Taheri T, Zahedifard F, Taslimi Y, Azizi H, Azadmanesh K, Papadopoulou B, Rafati S. Recombinant *Leishmania tarentolae* expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine.* 2009 Dec 10;28(1):53-62.

Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994 Jul-Aug;88(4):491-3.

Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 2002 Sep;18(9):399-405. Review.

Nasereddin A, Ereqat S, Azmi K, Baneth G, Jaffe CL, Abdeen Z. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. *J Parasitol.* 2006; 92(1):178-83.

Nunes CM, Lima VM, Paula HB, Perri SH, Andrade AM, Dias FE, Burattini MN. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol.* 2008;153(1-2):19-23.

Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger UJ. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *Am Vet Med Assoc.* 2001 Oct 15;219(8):1076-83.

Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, França-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(5):510-7.

Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine.* 2008 Mar 25;26(14):1709-24. Review.

Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E; Canine Leishmaniasis Working Group, Italian Society of Veterinarians of Companion Animals. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2010 Jun 1;236(11):1184-91.

Paz GF, Ribeiro MF, de Magalhães DF, Sathler KP, Morais MH, Fiúza VO, Brandão ST, Werneck GL, Fortes-Dias CL, Dias ES. Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. *Prev Vet Med.* 2010 Nov 1;97(2):131-3.

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

Quaresma PF, Murta SM, Ferreira Ede C, da Rocha-Lima AC, Xavier AA, Gontijo CM. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop.* 2009 Sep;111(3):289-94.

Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, da Silva SR, Moura Júnior AJ, Teixeira Neto RG, Madeira FM, Carvalho MB, Paglia AP, Melo MN, Gontijo CM. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011 Oct;105(10):579-85.

Reed SG. Diagnosis of leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 1996;14(5):471-8.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Corrêa-Oliveira R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2006;81(1):68-75.

Reis AB, Giunchetti RC, Carrillo E, Martins-Filho OA, Moreno J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends in Parasitology.* 2011. 26 (7): 341-349.

Regina-Silva S, Fortes-Dias CL, Michalsky EM, França-Silva JC, Quaresma PF, da Rocha Lima AC, Teixeira-Neto RG, Dias ES. Evaluation of parasitological examination, kDNA polymerase chain reaction and rK39-based immunochromatography for the diagnosis of visceral leishmaniasis in seropositive dogs from the screening-culling program in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014 Jul;47(4):462-8.

Resende DM, Caetano BC, Dutra MS, Penido ML, Abrantes CF, Verly RM, Resende JM, Piló-Veloso D, Rezende SA, Bruna-Romero O, Fernandes AP, Gazzinelli RT. Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: correlation with IFN-gamma and cytolytic activity by CD8+ T cells. *Vaccine.* 2008 Aug 18;26(35):4585-93.

Ribeiro RR, Moura EP, Pimentel VM, Sampaio WM, Silva SM, Schettini DA, Alves CF, Melo FA, Tafuri WL, Demicheli C, Melo MN, Frézard F, Michalick MS. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(7):2564-72.

Riera C, Valladares JE. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitol Today.* 1996 Oct;12(10):412.

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol.* 1990;71:267-75.

Romero AGS, Boelaert M (2010). Control of visceral leishmaniasis in Latin America-a systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4, e584.

Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. Further notes on Leishman's bodies. *Brit Med J.* 1903;2:1261,1401.

Rosypal A, Troy G, Duncan R, Zajac A, Lindsay D. Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania infantum infantum*. *J Vet Intern Med.* 2005;19:802-809.

Santos-Gomes GM, Capela MJ, Ramada J, Campino L. Experimental canine leishmaniasis: evolution of infection following re-challenge with *Leishmania infantum*. *Acta Trop.* 2003 Jul;87(2):235-44.

Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994; 89(3):471-8.

Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101:577-9.

Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009 Mar 9;160(1-2):55-9.

Slappendel RR, Greene CE. Leishmaniasis. In: *Infectious diseases of the dog and cat*, ed. Greene CE, 769-777. WB Saunders Co., Philadelphia, PA.1990.

Soares MR, de Mendonça IL, do Bonfim JM, Rodrigues JA, Werneck GL, Costa CH.

Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Trop.* 2011 Jan;117(1):6-9.

Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol.* 2000;90(1-2):37-45.

Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., The LeishVet Group, 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasit. Vectors* 4, 86.

Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis.* 2004;189(9):1729-33.

Teixeira-Neto RG, Giunchetti RC, Carneiro CM, Vitor RW, Coura-Vital W, Quaresma PF, Ker HG, de Melo LA, Gontijo CM, Reis AB. Relationship of *Leishmania*-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2010 May 11;169(3-4):248-57.

Testasica MC, dos Santos MS, Machado LM, Serufo AV, Doro D, Avelar D, Tibúrcio AM, Abrantes Cde F, Machado-Coelho GL, Grimaldi G Jr, Gazzinelli RT, Fernandes AP. Antibody responses induced by Leish-Tec®, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. *Vet Parasitol.* 2014 Aug 29;204(3-4):169-76.

Travi BL, Tabares CJ, 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.* 2001 Mar-Apr;64(3-4):119-24.

Verçosa BL, Lemos CM, Mendonça IL, Silva SM, de Carvalho SM, Goto H, Costa FA. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Vet Res.* 2008 Nov 6;4:45.

World Health Organization (WHO). The world health report 2002 - Reducing risks, promoting healthy life. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2002;192-197. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2002/en/>

World Health Organization (WHO)/TDR. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Natures Reviews Microbiology.* 2007;5:S7-S16.

Zanette MF, Lima VM, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RF, Biondo AW, Marcondes M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014 Jan-Feb;47(1):105-7.

Zanin FH, Coelho EA, Tavares CA, Marques-da-Silva EA, Silva Costa MM, Rezende SA, Gazzinelli RT, Fernandes AP. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes Infect.* 2007 Jul;9(9):1070-7.

Anexos

8 Anexos

8.1 Relação dos animais amostrados

| CÃO | FICHA | CHIP | CLÍNICA | NOME |
|-----|-------|-------|---------|--------------------|
| 1 | K429 | 7177 | S | Fofinha Preta |
| 2 | B436 | 7068 | S | Fofinha Marron |
| 3 | J408 | 10453 | A | Bethoven |
| 4 | L453 | 5814 | A | Hulk |
| 5 | D457 | 5253 | A | Doguim |
| 6 | A422 | 5068 | A | Madona |
| 7 | I472 | 5475 | S | Falcão |
| 8 | E479 | 5454 | A | Mineiro |
| 9 | E457 | 14620 | A | Ferrari |
| 10 | G479 | 5872 | A | Ratinho |
| 11 | H409 | 7363 | S | Leonça |
| 12 | I479 | 5661 | A | Malandro |
| 13 | J422 | 7811 | A | Mileide |
| 14 | K479 | 15711 | A | Bambina |
| 15 | H479 | 14988 | A | Hércules |
| 16 | K450 | 11894 | A | Leão/SRD |
| 17 | I450 | 15778 | A | Bob/SRD |
| 18 | L514 | 14963 | A | Toquinho |
| 19 | C469 | 7582 | A | Campeiro |
| 20 | C434 | 7744 | A | Léo Sumiço |
| 21 | B433 | 7069 | A | Sukita |
| 22 | B457 | 6158 | A | Duque |
| 23 | F417 | 14174 | S | Sadam |
| 24 | I457 | 7642 | A | Izadora |
| 25 | A400 | 14410 | A | Branquinha |
| 26 | B416 | 7790 | A | Piti |
| 27 | A401 | 15289 | A | Pitchula/SRD |
| 28 | H457 | 5651 | S | Natacha/SRD |
| 29 | L402 | 14391 | S | Radija/SRD |
| 30 | D413 | 5168 | A | Pitucha/SRD |
| 31 | E399 | 11560 | A | Nina/poodle |
| 32 | H422 | 6902 | S | Lobo/SRD |
| 33 | B404 | 14718 | A | Jack/SRD |
| 34 | J398 | 14045 | S | Preta Mãe/Pinscher |
| 35 | E521 | 7524 | S | Spaik/Beagle |
| 36 | F522 | 7077 | A | Grandona/Beagle |
| 37 | L439 | 6333 | S | Pity/pinscher |
| 38 | B516 | 14574 | A | Neguinho |
| 39 | I446 | 7076 | A | Foguinho |
| 40 | E450 | 5878 | A | Manteiguinha |
| 41 | J465 | 7046 | A | Rubi/SRD |
| 42 | B469 | 14224 | A | Rex/SRD |
| 43 | F466 | 6959 | A | Faísca/SRD |
| 44 | B463 | 5275 | A | Miquinho/Pinscher |
| 45 | F434 | 14833 | A | Jack/SRD |
| 46 | F520 | 7070 | A | Sem nome |
| 47 | J522 | 10366 | A | Beny |
| 48 | E520 | 11693 | A | Tupã |
| 49 | F518 | 14374 | A | Kiko/Beagle |
| 50 | K522 | 7840 | A | Malhado |

| | | | | |
|-----|------|-------|---|---------------|
| 51 | E523 | 5135 | A | SRD |
| 52 | H519 | 14728 | A | Beagle |
| 53 | G518 | 14199 | A | Sofia/Beagle |
| 54 | J525 | 6389 | A | Meggie/Beagle |
| 55 | I517 | 5731 | A | Kika/beagle |
| 56 | D521 | 14044 | A | She-ra |
| 57 | L523 | 6090 | A | Tom/Beagle |
| 58 | B518 | 14092 | A | Niki/Beagle |
| 59 | L524 | 7626 | A | Rec |
| 60 | C518 | 14117 | A | Spike |
| 61 | H518 | 5407 | A | Pintor/Beagle |
| 62 | E519 | 15827 | A | Ring |
| 63 | F411 | 5169 | A | Lincoln |
| 64 | H403 | 14189 | A | Kindi |
| 65 | B400 | 14697 | A | Sandy/SRD |
| 66 | H400 | 15449 | A | Laion/Poodle |
| 67 | J507 | 5924 | A | Kate |
| 68 | I514 | 15127 | A | Robin |
| 69 | I525 | 6980 | A | Beagle |
| 70 | C522 | 7148 | A | Beagle |
| 71 | D519 | 14132 | S | Beagle |
| 72 | C520 | 5137 | S | Beagle |
| 73 | C525 | 7231 | S | Beagle |
| 74 | C517 | 6487 | A | Beagle |
| 75 | K424 | 7181 | S | Beagle |
| 76 | J464 | 15557 | A | Dank/SRD |
| 77 | A433 | 5176 | A | Jully/SRD |
| 78 | L432 | 7004 | A | Sandy/SRD |
| 79 | G450 | 5291 | A | Fofinha/SRD |
| 80 | I432 | 7147 | A | Milu/Pinscher |
| 81 | G431 | 7662 | A | Lessie/SRD |
| 82 | J447 | 6846 | A | Tatá/SRD |
| 83 | I447 | 6608 | A | Bolinha/SRD |
| 84 | J457 | 6929 | A | Bianca/SRD |
| 85 | J450 | 5674 | A | Sandy/SRD |
| 86 | H450 | 14131 | A | Milonha/SRD |
| 87 | K452 | 7368 | A | Snoop |
| 88 | J407 | 5337 | A | Dexa/Pit Bull |
| 89 | G452 | 14266 | A | Pretinho/SRD |
| 90 | A430 | 5971 | A | Luke/SRD |
| 91 | J520 | 11422 | A | Tarzan/SRD |
| 92 | H462 | 14344 | A | Isnif/SRD |
| 93 | K462 | 14276 | A | Valina/SRD |
| 94 | D463 | 5719 | A | Nina/SRD |
| 95 | A463 | 7927 | A | Bili/SRD |
| 96 | J462 | 14820 | S | Pretinho/SRD |
| 97 | C521 | 6537 | A | Fred/Beagle |
| 98 | E517 | 5030 | A | Beagle |
| 99 | H523 | 15689 | S | Beagle |
| 100 | C447 | 11184 | S | Pretinha/SRD |
| 101 | C451 | 14351 | A | Feroz/SRD |
| 102 | B451 | 15891 | A | Zapo/SRD |
| 103 | F479 | 14223 | A | Shena/SRD |
| 104 | C475 | 15945 | A | Minie/SRD |

| | | | | |
|-----|------|-------|---|-----------------|
| 105 | F475 | 7047 | S | Foguim/SRD |
| 106 | C507 | 5930 | A | Bino/SRD |
| 107 | H452 | 10623 | S | Pity/SRD |
| 108 | H447 | 5220 | A | Fofinha/SRD |
| 109 | J472 | 14292 | A | Mel/SRD |
| 110 | I439 | 7885 | A | Bam Bam/SRD |
| 111 | B467 | 6067 | A | Lup/Pit Bull |
| 112 | H489 | 14198 | A | Jack/SRD |
| 113 | C492 | 15540 | S | Chocolate/SRD |
| 114 | F485 | 5115 | A | Tiozim/SRD |
| 115 | G397 | 14317 | A | Bendy/SRD |
| 116 | A455 | 5845 | A | Pitchula/SRD |
| 117 | H524 | 5774 | A | Beagle/July |
| 118 | J488 | 5180 | A | Brenda/SRD |
| 119 | J474 | 15879 | A | Felicia/SRD |
| 120 | I520 | 5444 | A | Beagle/Piti |
| 121 | I518 | 14451 | S | Beagle/Romeu |
| 122 | K519 | 5250 | S | beagle |
| 123 | I490 | 14999 | A | Segredo/SRD |
| 124 | C426 | 7286 | A | Bob/SRD |
| 125 | A494 | 5744 | A | Vitamina/SRD |
| 126 | D443 | 5666 | S | Raycan/Pit Bull |
| 127 | K493 | 5390 | A | Emili/SRD |
| 128 | H455 | 15114 | A | Xuxu/SRD |
| 129 | C448 | 7298 | A | Bruce/SRD |
| 130 | H448 | 11399 | A | Kita/SRD |
| 131 | C493 | 14015 | A | Feroz/SRD |
| 132 | J473 | 14435 | A | Jardoli/SRD |
| 133 | F463 | 14056 | S | Jade/SRD |
| 134 | H526 | 14670 | S | beagle |
| 135 | K517 | 7994 | A | beagle |
| 136 | H528 | 7916 | S | beagle |

8.2 Instrução Normativa Interministerial 31/2007

REGULAMENTO TÉCNICO PARA PESQUISA, DESENVOLVIMENTO, PRODUÇÃO, AVALIAÇÃO, REGISTRO E RENOVAÇÃO DE LICENÇAS, COMERCIALIZAÇÃO E USO DE VACINA CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

DAS DEFINIÇÕES

Fases: etapas às quais os produtos em desenvolvimento devem ser submetidos, obedecendo-se à evolução cronológica das mesmas, para que ao final do estudo obtenham-se dados e informações precisas sobre segurança, eficácia e outro atributo indispensável à avaliação do produto.

Eficácia: definida como a capacidade da vacina proteger os animais vacinados da infecção, sob as condições recomendadas pelo fabricante do produto conforme legislação vigente.

Eficácia vacinal: é o parâmetro que expressa a redução da incidência da infecção nos animais vacinados comparado com o mesmo indicador nos animais não-vacinados.

Potência: é um indicador de eficácia determinado por métodos apropriados.

Proteção: é o parâmetro que expressa a capacidade da vacina proteger os animais vacinados da infecção.

Desafio: inoculação em animais pela via de administração apropriada, de uma cepa de um determinado agente, em quantidade suficiente capaz de reproduzir a infecção natural e produzir sinais clínicos da doença.

Fase I: estudos de segurança para demonstrar a ausência de efeitos colaterais adversos relevantes em animais sadios, sensíveis ao agente em estudo, em condições de laboratório.

Fase II: nessa fase, além de confirmar a segurança, será determinada a imunogenicidade, a via de administração, a dose e esquema que serão utilizados na Fase III, bem como a estimativa preliminar da eficácia em animais sensíveis da espécie-alvo.

Fase III: destina-se à realização de estudos controlados, randomizados e mascarados para avaliar a eficácia vacinal.

Fase IV: compreende a fase de vigilância e pesquisa pósregistro do produto.

Art. 1º O desenvolvimento de vacinas antileishmaniose visceral canina deve contemplar a realização de testes para determinar a segurança, a eficácia, a inocuidade, a proteção, a infecção e a imunogenicidade das vacinas, conduzidos por meio de ensaios de Fase I, Fase II e Fase III.

Parágrafo único. Todas as fases de que trata este Anexo devem ser conduzidas, respeitando o bem-estar animal, seguindo critérios estritamente científicos e éticos.

Art. 2º Os ensaios biológicos específicos relacionados a vacinas antileishmaniose visceral canina, durante a fase de desenvolvimento devem:

I - estimar a suscetibilidade à infecção em animais vacinados, em ambiente controlado ou apenas em condições naturais.

II - avaliar a capacidade do cão vacinado para transmitir o agente ao vetor;

III - identificar métodos para distinguir entre infecção natural pela *Leishmania* (*Leishmania chagasi*) e a resposta imune ao produto vacinal; e

IV - definir a metodologia que quantificará a potência da vacina.

Art. 3º As fases do desenvolvimento das vacinas antileishmaniose visceral canina devem atender às definições já descritas com as seguintes especificidades:

I - Fase I: nesta fase deverá ser descrita a toxicidade local e sistêmica para doses únicas e repetidas.

II - Fase II: nesta fase os estudos devem:

a) continuar demonstrando que a vacina é segura para espécie alvo;

b) definir os parâmetros que mensurem a resposta imune, induzida pelo produto;

c) definir a dose e esquema de vacinação;

d) definir a metodologia que será utilizada para aferir a potência do produto e a eficácia vacinal, incluindo o teste desafio ou metodologia equivalente;

e) identificar os métodos para diferenciar cães vacinados de cães naturalmente infectados;

- f) demonstrar efeito protetor contra infecção e doença; e
- g) definir um método para avaliar a transmissão do parasito para o vetor.

III - Fase III: nesta fase os estudos devem:

- a) demonstrar de forma acurada a redução da incidência de infecção, doença e transmissão do parasito para o vetor;
- b) ser realizados no campo, preferencialmente, em municípios endêmicos com comprovada prevalência de infecção canina, segundo classificação do Ministério da Saúde;
- c) ter desenho amostral adequado, considerando a prevalência da infecção e doença canina e os resultados preliminares da eficácia obtida na Fase II;
- d) monitorar o perfil das reações adversas; e
- e) descrever as interações clínicas relevantes e restrições de uso do produto.

IV - Fase IV: nesta fase os estudos devem monitorar e informar a ocorrência de eventos adversos associados à vacinação.

Art. 4º Para registro junto ao Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento será necessário o cumprimento de todos os itens relacionados no art. 4º, nas Fases I, II e III.

Parágrafo único. Caberá ao MAPA a responsabilidade de consultar o Ministério da Saúde para emitir parecer sobre as características do produto em relação aos aspectos do programa de controle da leishmaniose visceral humana.

Art. 5º Sob demanda específica do Ministério da Saúde, o proprietário do produto deverá cooperar com a realização de estudos para avaliar impactos sobre a população humana.

Art. 6º O conteúdo e o uso da vacina fora das áreas de risco delimitadas pelo Ministério da Saúde não exime as empresas e os profissionais de responsabilidade.

§ 1º Os municípios nos quais a leishmaniose visceral canina é endêmica, segundo o Ministério da Saúde, só poderão utilizar vacinas que permitam diferenciar cães vacinados de cães infectados.

§ 2º Para realizar a comercialização de vacinas que permitem a diferenciação entre cães vacinados e cães infectados nos municípios indenes, deverá haver disponibilidade de kits para diagnóstico registrados no MAPA para tal fim.

§ 3º A indicação de uso do produto deverá ser atribuição exclusiva de um médico veterinário, salvo casos de interesse público conforme normatização do Ministério da Saúde.

§ 4º O médico veterinário deverá emitir atestado ou preencher cartão de vacinação que contenha todos os dados sobre a identificação do animal, sobre o responsável civil pelo animal, inclusive endereço completo, e informações completas do produto (nome, data de fabricação, data de validade, nº de partida, nº de doses). Estas informações devem ficar armazenadas por 5 (cinco) anos.

§ 5º O proprietário do registro do produto deve manter obrigatoriamente, durante, no mínimo, 3 (três) anos após a data de distribuição do produto, informações completas sobre os médicos veterinários responsáveis pela aplicação da vacina.

§ 6º O fabricante deverá encaminhar para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento relatórios trimestrais de produção, distribuição e os municípios nos quais o produto esteja sendo comercializado, como também o número de doses vendidas por município. Cabe ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento remeter trimestralmente os dados ao Ministério da Saúde.

§ 7º A vacina deverá ser usada somente em cães com diagnóstico sorológico negativo para leishmaniose visceral, utilizando kits para diagnóstico registrados no MAPA.

Art. 7º Além das exigências contidas no presente regulamento, o registro dos produtos deverá obedecer à legislação geral de produtos de uso veterinário em vigor e ainda conter na rotulagem e material informativo:

§ 1º A bula e o material de propaganda devem destacar "A vacina deverá ser usada somente em cães assintomáticos com resultados sorológicos negativos para leishmaniose visceral".

§ 2º A bula, o material de propaganda e o atestado ou cartão de vacinação devem conter os seguintes dizeres: "A vacinação não é o único instrumento de prevenção e controle desta enfermidade. Outras medidas também devem ser adotadas conforme normatização do Ministério da Saúde. Os animais vacinados que apresentarem sinais clínicos de leishmaniose

visceral, reações sorológicas positivas que não possam ser atribuídas à imunidade vacinal estarão passíveis de adoção das medidas sanitárias vigentes"; e

§ 3º A bula dos produtos conterá ainda os seguintes dizeres:

"O médico veterinário deverá obrigatoriamente manter sob sua guarda, durante, no mínimo, 3 (três) anos após a última dose da vacina, cadastro e registro sobre informações completas do produto (nome, data de fabricação, data de validade, nº de partida, nº de doses); informações sobre o responsável civil pelo animal, incluindo o endereço completo e ainda a identificação completa do animal vacinado, bem como as datas de vacinação do mesmo".

Art. 8º No caso de vacina desenvolvida no exterior, para registro no Brasil, deverá ser submetida a ensaios clínicos de Fase III no Brasil.

Parágrafo único. Quando não submetidos a ensaios prévios com *Leishmania (Leishmania) chagasi* devem ser realizados ensaios de Fase II no Brasil.

Art. 9º Controle de Elaboração: todas as fases de produção e controle serão registradas em protocolos específicos.

Art. 10. Pesquisa de Agentes Estranhos: devem ser realizados testes de pesquisa para agentes estranhos em sementes, substratos, produto final e diluentes. Devem ser utilizadas técnicas e procedimentos previstos em farmacopéias ou referências nacionais ou internacionais aceitos pelo MAPA, visando pesquisa de agentes aeróbios, anaeróbios e fungos. A esterilidade e a sensibilidade dos meios utilizados devem ser comprovadas. No caso de crescimento de agentes contaminantes a partida deverá ser considerada imprópria para a comercialização e destruída.

Art. 11. Controle de Inocuidade: devem ser utilizadas técnicas e procedimentos previstos em farmacopéias ou referências nacionais ou internacionais aceitos pelo MAPA, visando verificar a inocuidade do produto em animais de laboratório ou na espécie-alvo.

Art. 12. Controle de Potência: devem ser utilizadas técnicas e procedimentos validados perante o MAPA, visando verificar a potência do produto in vitro ou in vivo utilizando animais de laboratório ou espécie-alvo.

Art. 13. O prazo de validade das vacinas será de até 24 (vinte e quatro) meses, a contar da data da fabricação.

Art. 14. Dose e vias de aplicação: a critério do laboratório fabricante, segundo resultados de estudo de Fase II.

D.O.U., 10/07/2007 - Seção 1

8.3 Certificado Comitê de Ética em Pesquisa



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone: (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: procep@ufop.br



OFÍCIO CEP Nº. 58/2008, de 2 de setembro de 2008.

**Ilmo. Sr.
Prof. Dr. George Luiz Lins Machado Coelho
DECME/UFOP**

Senhor Professor,

É com prazer que comunicamos a **aprovação**, por este Comitê, de seu Projeto nº 2008/04 – "Ensaio Clínico, randomizado, mascarado, controlado por placebo para avaliar a eficiência da Vacina Leish-Tec® (Hertape Calier, Brasil) anti-Leishmaniose Visceral Canina".

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Maria Lúcia Pedrosa
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa/UFOP
Câmara de Experimentação Animal**