JOEDH DOS SANTOS

**Utilização de técnicas sorológicas e moleculares na distinção de cães
vacinados e naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. José Ângelo Lauletta
Lindoso

São Paulo
2021

JOEDH DOS SANTOS

**Utilização de técnicas sorológicas e moleculares na distinção de cães
vacinados e naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. José Ângelo Lauletta
Lindoso

**São Paulo
2021**

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Joedh dos

Utilização de técnicas sorológicas e moleculares
na distinção de cães vacinados e naturalmente
infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi* /
Joedh dos Santos. -- São Paulo, 2021.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: José Ângelo Lauletta Lindoso.

Descritores: 1.Leishmaniose visceral/veterinária
2.Estudos soroepidemiológicos 3.Vacinas 4.Coleira
5.Reação em cadeia de polimerase 6.Cães 7.Imunização
8.Antígenos

USP/FM/DBD-200/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

“Dedico este trabalho a Deus por permitir mais essa graça em minha vida e também a minha querida mãe Inês, por ter sido uma das principais colunas de minha vida, sem ela não teria conseguido meus graus na educação e escolaridade. Dizer obrigado não é o suficiente pela tamanha gratidão que tenho do seu amor por mim, mesmo em dores ou alegrias, jamais chegaria aqui se não fosse por você. Por último, dedico em memória a minha avó Neuza (minha segunda mãe) que já está com Deus, eterna mãe, conselheira e amiga. Eu te amo eternamente.”

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus, entidade que tenho fé. Grato sou ao Senhor por suas misericórdias se renovarem todos os dias.

A minha eterna querida avó Neuza Correa (mãe Neuza) que já está no céu, sempre acreditou em meu potencial. Sou muito grato a ela, partiu para os braços de Deus, mas creio que todos meus sonhos que ela desejou para mim nesta terra serão concretizados nesse mundo, eu te amarei para sempre minha eterna Mamãe Neuza.

Aos meus parentes pelo apoio em qualquer natureza, principalmente aqueles que sempre entenderam minhas dores, minhas lutas e nunca me negaram conforto e ajuda.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Ângelo Lauletta Lindoso que me permitiu ser seu aluno e desenvolver essa pesquisa no IMT-USP. Sei que não fui seu melhor orientando, mas agradeço a oportunidade de ter aprendido muitas coisas. Afinal, toda experiência para a vida é válida.

A Dra. Lúcia Maria Almeida Braz por ter me oferecido ajuda quando eu estava perdido no IMT-USP. Obrigado pela oportunidade de me apresentar ao Dr. José Ângelo, sou grato a sua generosidade, paciência e atenção durante esse tempo e também agradeço por me coorientar nos experimentos biomoleculares.

Ao Dr. Norival Kesper Júnior (Júnior) da protozoologia pela paciência ao me ensinar passo-a-passo as padronizações do teste ELISA-LESA. Agradecido sou pelos bons momentos que passei junto aos seus alunos, divertimentos, conversas e risos em seu laboratório. Também agradeço as ajudas vindas do seu aluno Rafael d'Avilla.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares por doar as amostras biológicas dos cães para concretização deste trabalho.

Ao Dr. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto por me auxiliar nos diagnósticos sorológicos por meio do teste ELISA com antígeno *L. major*-like no Instituto Adolfo Lutz.

A M.^a Edite Hatsumi Yamashiro Kanashiro que me auxiliou em preparar o primeiro lote do antígeno LESA.

A Dra. Camila Aparecida de Carvalho da protozoologia que me cedeu um pouco de sua cultura para preparar meu antígeno LESA.

A Dra. Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte, além de me ceder seu laboratório para as análises de PCR convencional, ajudou-me quando precisava e me salv

vários erros nos experimentos. Você foi uma fada madrinha na protozoologia para mim.

A mestre Renata Elen Costa da Silva que sequenciou minhas amostras de PCR já amplificadas.

A Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez que me orientou nas análises estatísticas.

A amiga Dra. Sandra Regina Castro Soares que me ouviu bastante quando eu precisava desabafar em momentos conturbados. Sua atenção foi essencial para mim, Sandrinha.

Aos meus amigos e colegas da pós no geral, em particular alguns – Luiz Camargo pelo seu companheirismo, Jaqueline Delprete, Vinícius Lima e demais.

A USP e também a FAPESP por todas as oportunidades que me concederam em minhas pesquisas, custeio de viagens, congressos e por pessoas maravilhosas as quais tive oportunidade de conhecer.

Aos professores pesquisadores que aceitaram avaliar meu trabalho na banca examinadora.

A todas as pessoas, ONGs e países no mundo que contribuem para erradicação de leishmaniose no mundo, principalmente em pessoas vulneráveis e cães.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram comigo em meu sucesso pós-acadêmico, a todos:

Muito Obrigado. ♥

“A única coisa que cai do céu é chuva, o resto é luta.”

(Autor desconhecido)

RESUMO

Santos J. *Utilização de técnicas sorológicas e moleculares na distinção de cães vacinados e naturalmente infectados por Leishmania (L.) infantum chagasi* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

No Brasil, a leishmaniose Visceral (LV) é causada por *Leishmania (L.) infantum chagasi* e transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* sendo o cão o principal reservatório urbano. A interrupção da transmissão se baseia na identificação e eliminação de cães infectados e mais recentemente, na possibilidade de uso de coleiras impregnadas com inseticidas e imunização pela aplicação de vacinas. Dentro deste contexto de imunização, um dos problemas é a distinção de cães imunizados daqueles naturalmente infectados, já que os métodos atualmente empregados em inquéritos sorológicos, não permitem essa diferenciação. A busca de ferramentas que distingam essas duas populações de cães em áreas de transmissão de leishmaniose visceral canina é fundamental. O objetivo desse trabalho foi avaliar por meio de métodos sorológicos (teste rápido TR-DPP, ELISA *L. major-like* e ELISA-LESA) e molecular (PCR convencional) a possibilidade de distinguir cães imunizados de cães naturalmente infectados. Foram usadas amostras de soros e de DNA extraído de linfonodo, procedentes de uma coorte de cães imunizados e não imunizados com duas diferentes vacinas comerciais, com ou sem uso de coleira impregnada com inseticida, da cidade de Panorama-SP. Foram avaliadas 600 amostras colhidas nos tempos: “-1 a 0 (1º tempo)”, após 180 (2º tempo) e 360 dias (3º tempo). A interpretação dos resultados foi por meio dos testes Q de Cochran (p*), Qui-quadrado (p**) e kappa. Os nossos resultados sugerem que os métodos sorológicos empregados neste estudo, não permitem distinguir cães vacinados daqueles naturalmente infectados e a detecção de DNA em amostra de linfonodo é o método confirmatório de infecção de cães por *L. infantum*. Ademais, os nossos resultados permitem concluir que nenhum dos métodos de prevenção usados nesta coorte foram capazes de prevenir a infecção, visto que houve detecção de DNA de *L. infantum* em todos os grupos estudados.

Descritores: Leishmaniose visceral/veterinária; Estudos soropidemiológicos; Vacinas; Coleira; Reação em cadeia de polimerase; Cães; Imunização; Antígenos.

ABSTRACT

Santos J. *Use of serological and molecular techniques in distinguishing dogs vaccinated and naturally infected by Leishmania (L.) infantum chagasi* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

In Brazil, Visceral leishmaniasis (LV) is caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* and transmitted by sandflies of the genus *Lutzomyia*, with the dog being the main urban reservoir. The interruption of transmission is based on the identification and elimination of infected dogs and, more recently, the possibility of using collars impregnated with insecticides and immunization prevention with the use of vaccines. Within this context of immunization, one of the problems is the distinction between immunized dogs and those naturally infected, since the methods currently used in serological surveys do not allow to differentiate naturally infected from immunized dogs. In this way and so, searching for tools that distinguish these two populations of dogs in areas of transmission of canine visceral leishmaniasis. The objective of this work is to evaluate whether, through serological methods (rapid TR-DPP®, ELISA *L. major*-like and ELISA-LESA) and molecular (conventional PCR) tests, it is possible to distinguish immunized dogs from naturally infected dogs. Samples of serum and DNA extracted from lymph nodes were used, coming from a cohort of dogs immunized and not immunized with two different commercial vaccines, with or without the use of a collar impregnated with insecticide, from the city of Panorama-SP. 600 samples collected at the times were evaluated: "-1 to 0 (1st time)", after 180 (2st time) and 360 days (3st time). The results were interpreted using the Cochran Q (p *), Chi-square (p **) and kappa tests. Our results suggest that the serological methods used in this study, do not allow to distinguish vaccinated dogs from those naturally infected and the detection of DNA in a lymph node sample is the confirmatory method of infection of dogs by *L. infantum*. Furthermore, our results allow us to conclude that none of the prevention methods used in this cohort were able to prevent infection, since there was detection of *L. infantum* DNA in all groups studied.

Descriptors: Leishmaniasis, visceral/ veterinary; Seroepidemiologic studies; Vaccine; Collar; Polymerase Chain Reaction; Dogs; Immunization; Antigens.

LISTA DE ABREVIATURAS

BEPA: Boletim Epidemiológico Paulista

CEUA: Comissão de Ética do Uso de Animais

CN -: Controle negativo

CP +: Controle positivo

DNA: *Deoxyribo Nucleic acid*, em português – Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidade óptica

EAL *chagasi*: Extrato alcalino de *Leishmania infantum chagasi*

EALsey17: Extrato alcalino de *Leptomonas seymouri*

ELISA: *Enzyme Linked. Immunosorbent Assay*, em português – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

g: Gramas

G: Grupo

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

HCl: Ácido clorídrico

IC: Intervalo de Confiança

IFI: Imunofluorescência Indireta

IMT-USP: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo

KDNA: DNA de Kinetoplasto

LESA: *Leishmania Excreted Secreted Antigen*, em português – Antígeno Excretado e Secretado de *Leishmania*

LV: Leishmaniose visceral

LVC: Leishmaniose Visceral Canina

M: Molar

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mL: Mililitros

MS: Ministério da Saúde

N: Normal

ng: nanogramas

Nm: nanômetro

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPD: O-Phenylenediamine dihydrochloride

p:** Teste qui-quadrado

p*: Teste Q de Cochran

pb: Pares de bases

PBS: *Phosphate buffered saline* em português – Solução tamponada de fosfato

PCR: *Polimerase Chain Reaction*, em português – Reação em Cadeia da Polimerase

pH: Potencial Hidrogeniônico

Pmol: peso molecular

RCF: *Relative Centrifugal Force*, em português – Força Centrifuga Relativa

RNA: *RiboNucleic Acid*, em português – Ácido ribonucleico

ROC: *Receiver Operating Characteristic Curve*, em português – Curva Característica de Operação do Receptor

RPM: *Revolutions per minute*, em português – Rotação por minuto

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium

s: segundos

SP: São Paulo

TR-DPP®: Test Rapid-Dual Path Platform

α: Alfa

°C: Graus celsius ou centigrados

μL: microlitro

%: por cento

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Formas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Promastigotas em roseta (A). Amastigotas rompendo macrófago (B). Imagens gentilmente cedidas pelo laboratório de Soroepidemiologia e Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo - IMT/USP. 2021.....19
- Figura 2: Mapa à direita, Municípios onde se confirmou a presença do reservatório canino infectado, segundo o BEPA - Boletim Epidemiológico Paulista, dezembro de 2017. Mapa à esquerda, classificação Epidemiológica para LVC, segundo o BEPA - Boletim Epidemiológico Paulista, dezembro de 2017 (HIRAMOTO, et al. 2019)20
- Figura 3: Titulação, por ELISA indireto, de antígeno LESA (lote 2) com amostras sorológicas positivas e negativas. Título 1:5 foi utilizado como padrão para ELISA-LESA pela maior diferenciação entre soros positivos e negativos.....34
- Figura 4: Curva ROC e distribuição dos resultados de absorbância dos soros caninos submetidos a ELISA indireto com antígeno LESA. A curva ROC foi construída com 24 amostras dos soros de cães positivos para leishmaniose visceral e 25 negativos. ROC – Receiver Operating Characteristic.....35
- Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 2% de amostras amplificadas por PCR convencional, utilizando os oligoiniciadores RV1 e RV2 direcionados para porção do minicírculo do KDNA de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. DNA de cães do G1. Amostras positivas 3, 6, 10 e 13 amplificaram à altura de 145 pb. CP + (controle positivo), CN - (controle negativo), pb (pares de base)36
- Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 2% de amostras amplificadas por PCR convencional, utilizando os oligoiniciadores RV1 e RV2 direcionados para porção do minicírculo do KDNA de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. DNA de cães do G2. Amostras positivas 2, 5, 7, 9 e 15 amplificaram à altura de 145 pb. CP + (controle positivo), CN - (controle negativo), pb (pares de base)36
- Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 2% de amostras amplificadas por PCR convencional, utilizando os oligoiniciadores RV1 e RV2 direcionados para porção do minicírculo do KDNA de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. DNA de cães do

G3. Amostras positivas 2, 5, 8, 11 e 15 amplificaram à altura de 145 pb. CP + (controle positivo), CN - (controle negativo), pb (pares de base)37

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 2% de amostras amplificadas por PCR convencional, utilizando os oligoiniciadores RV1 e RV2 direcionados para porção do minicírculo do KDNA de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. DNA de cães do G4. Amostras positivas 8, 9 e 14 amplificaram à altura de 145 pb. CP + (controle positivo), CN - (controle negativo), pb (pares de base).....37

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 2% de amostras amplificadas por PCR convencional, utilizando os oligoiniciadores RV1 e RV2 direcionados para porção do minicírculo do KDNA de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. DNA de cães do G5. Amostras positivas 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 14, 15 e 16 amplificaram à altura de 145 pb. CP + (controle positivo), CN - (controle negativo), pb (pares de base).....38

Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 2% de amostras amplificadas por PCR convencional, utilizando os oligoiniciadores RV1 e RV2 direcionados para porção do minicírculo do KDNA de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. DNA de cães do G6. Amostras positivas 6, 7, 12, 14 e 15 amplificaram à altura de 145 pb. CP + (controle positivo), CN - (controle negativo), pb (pares de base).....38

Figura 11: Exemplo de sequenciamento de amostras de DNA de cães que foram positivas para *Leishmania* pela técnica de PCR convencional. Todas as 34 amostras foram positivas por PCR convencional, usando os oligoiniciadores RV1 e (continuação Figura 11) RV2 foram sequenciadas e analisadas no SANGER, sendo identificadas como *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*.....40

Figura 12: Positividade dos testes TR-DPP® + ELISA *L. major*-like, ELISA-LESA e PCR convencional na avaliação das 200 amostras de cães, nos diferentes grupos, no 1º T. G1: Cães que não utilizaram coleira e não foram vacinados; G2: Cães que utilizaram a coleira impregnada com deltametrina, trocadas a cada quatro meses; G3: Cães imunizados pela vacina Leishmune® (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); G4: Cães imunizados pela vacina Leish-tech® (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); G5: Cães imunizados pela vacina Leishmune®, portando coleira; G6: Cães imunizados pela vacina Leish-tech®, portando coleira. Teste Q de Cochran - G1 - p = 0,368; G2 - p = 0,607; G3 - p = 0,867; G4 - p = 0,006 (DPP + ELISA- *L. major*-like ≠

(continuação figura 12) ELISA LESA e PCR convencional $\neq$ ELISA LESA); G5 - $p = 0,002$ (DPP + ELISA- *L. major*-like $\neq$ PCR convencional e ELISA LESA $\neq$ PCR convencional); G6 - $p = 1,000$45

Figura 13: Positividade dos testes TR-DPP® + ELISA *L. major*-like, ELISA-LESA e PCR convencional na avaliação das 200 amostras de cães, nos diferentes grupos, no 2º T. G1: Cães que não utilizaram coleira e não foram vacinados; G2: Cães que utilizaram a coleira impregnada com deltametrina, trocadas a cada quatro meses; G3: Cães imunizados pela vacina Leishmune® (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); G4: Cães imunizados pela vacina Leish-tech® (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); G5: Cães imunizados pela vacina Leishmune®, portando coleira; G6: Cães imunizados pela vacina Leish-tech®, portando coleira. Teste Q de Cochran - G1 - $p = 0,097$; G2 - $p = 0,135$; G3 - $p = 0,651$; G4 - $p = 0,023$ (ELISA LESA $\neq$ PCR convencional); G5 - $p = 0,032$ (ELISA LESA $\neq$ PCR convencional); G6 - $p = 0,018$ (TR-DPP® + ELISA- *L. major*-like $\neq$ ELISA LESA e PCR convencional $\neq$ ELISA LESA).....46

Figura 14: Positividade dos testes TR-DPP® + ELISA *L. major*-like, ELISA-LESA e PCR convencional na avaliação das 200 amostras de cães, nos diferentes grupos, no 3º T. G1: Cães que não utilizaram coleiras i e não foram vacinados; G2: Cães que utilizaram a coleira impregnada com deltametrina, trocadas a cada quatro meses; G3: Cães imunizados pela vacina Leishmune® (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); G4: Cães imunizados pela vacina Leish-tech® (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); G5: Cães imunizados pela vacina Leishmune®, portando coleira; G6: Cães imunizados pela vacina Leish-tech®, portando coleira. Teste Q de Cochran - G1 - $p = 0,276$; G2 - $p = 0,779$; G3 - $p = 0,050$ (ELISA LESA $\neq$ PCR convencional); G4 - $p = 0,002$ (ELISA LESA $\neq$ PCR convencional); G5 - $p = 0,307$; G6 - $p = 0,115$47

Figura 15: Positividade dos testes TR-DPP® + ELISA *L. major*-like, ELISA-LESA e PCR convencional na avaliação das 600 amostras de 200 cães, nos três tempos. Teste Q de Cochran - 1º T - $p = 0,058$; 2º T - $p < 0,001$ (TR-DPP® + ELISA *L. major*-like $\neq$ PCR convencional e ELISA LESA $\neq$ PCR convencional); 3º T - $p = 0,001$ (ELISA LESA $\neq$ PCR convencional).....48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Distribuição dos grupos de cães provenientes do município de Panorama-SP, de acordo com as intervenções realizadas.....	26
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos iniciadores de kDNA PCR convencional, peso molecular do fragmento amplificado, artigo de referência e condições da kDNA PCR convencional RV1 e RV2.....	32
Tabela 2: Distribuição das amostras positivas na PCR convencional em relação aos grupos de intervenção e tempo de coleta de amostras. 1º T: antes da intervenção. 2º T: 180 dias após a intervenção. 3º T: 360 dias após a intervenção. G1: Cães que não utilizaram as coleiras inseticidas e não foram vacinados; G2: Cães que utilizaram a coleira impregnada com deltametrina, trocadas a cada quatro meses; G3: Cães imunizados pela vacina Leishmune® (2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); G4: Cães imunizados pela vacina Leish-tech® (2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); G5: Cães imunizados pela vacina Leishmune®, portando coleira; G6: Cães imunizados pela vacina Leish-tech®, portando coleira.....	39
Tabela 3: Positividade e intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) de TR-DPP® + ELISA <i>L. major</i> -like dos três tempos avaliados de acordo com o grupo de animais.....	42
Tabela 4: Positividade e intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) de ELISA-LESA nos três tempos avaliados de acordo com o grupo de animais.....	43
Tabela 5: Positividade e intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) de PCR convencional nos três tempos avaliados de acordo com o grupo de animais.....	44
Tabela 6: Presença de concordância entre TR-DPP® + ELISA <i>L. major</i> -like e ELISA-LESA.....	49
Tabela 7: Presença de concordância entre TR-DPP® + ELISA <i>L. major</i> -like e PCR convencional.....	49
Tabela 8: Presença de concordância entre ELISA-LESA e PCR convencional.....	50

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	19
2 - OBJETIVO.....	24
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 - DELINEAMENTO E LOCAL DO ESTUDO.....	24
3.2 - AMOSTRAS, PERÍODO DE COLETA E LOCAL DE EXPERIMENTO.....	25
3.3 - CATEGORIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	26
3.4 - MÉTODOS LABORATORIAIS.....	26
3.4.1 - TESTES SOROLÓGICOS.....	26
3.4.1.2 - TR-DPP®.....	26
3.4.1.3 - ELISA <i>LEISHMANIA MAJOR</i> -LIKE.....	27
3.4.1.4 - ELISA-LESA.....	27
3.4.2 - TESTE MOLECULAR, REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE CONVENCIONAL, <i>Polimerase Chain Reaction</i> - PCR CONVENCIONAL E SEQUENCIAMENTO...	29
3.4.2.1 - DNA DAS AMOSTRAS E CONTROLES.....	29
3.4.2.2 - PADRONIZAÇÃO DE PCR CONVENCIONAL.....	29
3.4.2.3 - SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS.....	29
3.4.2.3.1 - SEQUENCIAMENTO POR RV1 E RV2.....	29
3.4.2.3.1.1 - PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR CONVENCIONAL.....	29
3.4.2.3.1.2 - QUANTIFICAÇÃO EM GEL DE AGAROSE.....	30
3.4.2.3.1.3 - REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	30
3.4.2.3.1.4 - PRECIPITAÇÃO.....	30
3.4.2.3.1.5 - DESNATURAÇÃO.....	31
3.4.2.3.1.6 - CORRIDA.....	31
3.4.2.3.1.7 - ANÁLISE DE DADOS GERADOS PELO SEQUENCIAMENTO.....	31
3.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4 - RESULTADOS.....	34
4.1 - TITULAÇÃO, ESPECIFICIDADE DO TESTE ELISA-LESA.....	34
4.2 - TESTE QUALITATIVO DE PCR CONVENCIONAL.....	36
4.3 - POSITIVIDADE DO TR-DPP® + ELISA <i>L. MAJOR</i> -LIKE, ELISA-LESA E PCR CONVENCIONAL NOS SEIS GRUPOS DE ANIMAIS EM FUNÇÃO DO TEMPO AVALIADO.....	41
5 - DISCUSSÃO.....	51
6 - CONCLUSÃO.....	59
7 - REFERÊNCIAS.....	60
8 - ANEXOS.....	66
8.1 - CERTIFICADO CEUA.....	66
8.2 - RESULTADOS TABELADOS.....	67

1 - INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada, no Brasil, por *Leishmania (L.) infantum*, sinônimo de *L. chagasi*, também denominada *L. (L.) infantum chagasi* (Figura 1). Os canídeos são um importante reservatório e responsáveis pela manutenção da transmissão em ambiente urbano. A leishmaniose visceral humana (LV) é potencialmente fatal, e afeta cerca de 200.000 a 400.000 pessoas anualmente com aproximadamente 20.000 a 40.000 óbitos (DANTAS-TORRES et al., 2019). De acordo com os últimos dados da OMS – (Organização Mundial de Saúde), a doença ocorre em mais de 80 países, sendo o Brasil, um dos países com maior número de casos (“WHO | Epidemiological situation”).

Figura 1: Formas de *Leishmania infantum chagasi*. Promastigotas em roseta (A). Amastigotas rompendo macrófago (B). Imagens gentilmente cedidas pelo laboratório de Soroepidemiologia e Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo - IMT/USP. 2021.

A transmissão é vetorial por insetos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Dentre os gêneros de flebotomíneos que ocorrem no continente americano, o *Lutzomyia* é o maior em número de espécies, com ampla distribuição geográfica, desde os Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil, *L. longipalpis* é considerada a principal espécie transmissora de *L. infantum chagasi*, sendo que no Mato Grosso do Sul, *Lutzomyia cruzi* é a mais prevalente como vetor da doença (KAZIMOTO et al., 2018).

O agente etiológico da LV é do gênero *Leishmania*, família *Trypanosomatidae* e ordem *Trypanosomatida*. Compreende as espécies do complexo *Leishmania*

(*Leishmania*) *donovani*: a *L. (L.) donovani* que é antroponótico e ocorre na Índia, Paquistão, China Oriental, Bangladesh, Nepal, Sudão e Quênia. A *L. (L.) infantum* uma espécie zoonótica que ocorre na região sudoeste e central da Ásia, Nordeste da China, Norte da África e Europa Mediterrânea e no Novo Mundo, incluso Brasil (MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL, 2014).

Em áreas de transmissão da LV humana, tanto os cães sintomáticos, como assintomáticos, desempenham papel importante no ciclo de transmissão urbana (Figura 2) (HIRAMOTO, et al. 2019). Segundo o Ministério da Saúde (MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE, 2014), os sinais mais comuns da LVC são as alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose), onicogrifose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e paresia dos membros posteriores, hepatomegalia, adenomegalia e esplenomegalia.

Figura 2: Mapa à direita, Municípios onde se confirmou a presença do reservatório canino infectado, segundo o BEPA - Boletim Epidemiológico Paulista, dezembro de 2017. Mapa à esquerda, classificação Epidemiológica para LVC, segundo o BEPA - Boletim Epidemiológico Paulista, dezembro de 2017 (HIRAMOTO, et al. 2019).

Os medicamentos utilizados atualmente para tratar a LV não eliminam por completo o parasito nas pessoas e em cães. Nos cães, o tratamento pode até resultar no desaparecimento dos sinais clínicos, porém eles continuam como fontes de infecção para o vetor, e, portanto, um risco para saúde da população humana e canina. De acordo com o Ministério da Saúde, a eutanásia canina é recomendada como uma das formas de controle da LV, realizada de forma integrada às demais outras ações recomendadas (LEISHMANIOSE VISCERAL, 2021).

O diagnóstico clínico da LVC é difícil de ser determinado devido à grande porcentagem de cães assintomáticos ou oligossintomáticos existentes. Além do mais, a LVC apresenta manifestações clínicas semelhantes às de outras enfermidades infectocontagiosas que acometem os cães. O diagnóstico clínico-epidemiológico poderá ser possível quando o animal apresenta sinais comuns à doença, e quando o animal se originar de regiões ou áreas de transmissão estabelecida (LEISHMANIOSE VISCERAL, 2021). A confirmação do diagnóstico de LVC se baseia em métodos laboratoriais que determinam a presença do parasito ou então que detectem anticorpos anti-*Leishmania*. De forma geral, há quatro tipos de métodos de diagnóstico laboratorial para leishmaniose visceral canina: parasitológico, sorológico, imunoistoquímico e molecular. Em 2012, o Ministério da Saúde determinou a utilização do teste rápido imunocromatográfico como triagem, seguido do confirmatório ELISA com antígeno *Leishmania (L.) major*-like, para definição de LVC (MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL, 2014). O TR-DPP® emprega o antígeno recombinante rK28, uma quimera que combina os antígenos rK9, rK26 e rK39 de *L. infantum* (PATTABHI et al., 2010).

O controle da LV se baseia no manuseio ambiental, no controle do vetor e do reservatório e no diagnóstico precoce dos casos humanos. O manuseio ambiental essencial é recomendado através da limpeza periódica dos terrenos, por meio de retirada da matéria orgânica em decomposição e destino adequado desse lixo, a fim de impedir o desenvolvimento das formas imaturas do vetor. A limpeza dos abrigos de animais domésticos e a manutenção de animais domésticos distantes das casas, principalmente à noite, reduz a atração dos flebotomíneos para o intradomicílio. O controle vetorial se dá por meio do uso de inseticidas, mas sua indicação é apenas para as áreas com muitos casos, como áreas de transmissão intensa, moderada ou em surto, porém, essa medida é apenas para o inseto adulto (MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE, 2014). Um dos pilares considerados de suma importância é o controle do reservatório canino através da eutanásia de cães sintomáticos ou assintomáticos, porém mesmo com a adoção das medidas de controle empregadas rotineiramente, observa-se um aumento na área de ocorrência da LV humana no Brasil (ROMERO, GA; BOELAERT, M, 2010).

Outros métodos para controle da LV têm sido propostos e avaliados, porém com resultados controversos. O uso de coleiras impregnadas com deltametrina tem se mostrado bastante promissor, pois a deltametrina é um inseticida do grupo químico dos piretróides, capaz de repelir o inseto flebotomíneo. Estudos controlados demonstram que cães encoleirados, quando postos em gaiolas teladas com insetos flebotomíneos das espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia migonei*, apresentaram proteção contra as picadas de até 96%, e a taxa de mortalidade dos flebótomos foi superior a 90%, com proteção por até 8 meses, o que pode ser bastante útil no controle da LVC (DAVID et al., 2001; KILLICK-KENDRICK et al., 1997). Silva et al., (2018), realizaram um trabalho de campo, utilizando coleira impregnada com deltametrina, como possível mecanismo de controle vetorial e observaram uma redução significativa na captura de flebotomíneos nas áreas onde foi implementada o uso de coleira. Este achado reforça a hipótese de que coleira impregnada com piretroide é uma ferramenta que pode ser usada no controle da expansão da LV.

Outra ferramenta, que tem sido proposta no controle da LV é a utilização de vacinas contra *Leishmania*. Qualquer vacina e/ou método imunoterápico eficaz contra LVC poderia contribuir também para o controle da doença em humanos (TESH, 1995; DYE, 1996). Vários antígenos de *Leishmania* têm sido explorados para a utilização, os quais poderiam ser usados em vacinas contra leishmaniose. Dentre estes antígenos se incluem *Leishmania* atenuada viva, proteínas recombinantes de *Leishmania*, proteínas codificadas do DNA e imunomoduladores. Os principais desafios do desenvolvimento da vacina contra a leishmaniose são a complexidade associada com a antigenicidade, resposta desigual pelo hospedeiro, variabilidade nas diferentes espécies de *Leishmania*, e custos associados ao desenvolvimento da vacina (JAIN; JAIN, 2015). No Brasil foram registradas duas vacinas anti-*Leishmania* para uso em cães respectivamente: Leishmune® e Leish-Tec®. Atualmente só a Leish-Tec® encontra-se registrada e aceita para uso em cães (JAIN; JAIN, 2015).

A vacina Leish-Tec® utiliza um antígeno recombinante, A2, uma cisteína protease específica de amastigotas de *Leishmania donovani* capaz de induzir resposta imune celular e humoral (GHOSH, A; ZHANG, WW, et al., 2001). Ensaio clínicos preliminares mostraram que a vacina confere algum nível de proteção em modelos experimentais (ZANIN, FH et al., 2007; GRIMALDI, G Jr et al., 2014) em

ensaios controlados com cães expostos naturalmente (FERNANDES et al., 2008; FERNANDES, CB et al., 2014). Grimaldi, et al., 2017, em ensaio clínico de campo, observaram que a vacinação de cães com Leish-Tec® induziu a produção de imunoglobulinas G anti-leishmania, entretanto não houve diferença na incidência acumulativa de infecção canina, quando comparada ao grupo controle, sem imunização.

A vacina Leishmune® utiliza como antígeno uma glicoproteína de promastigotas de *Leishmania donovani*, denominada fucose manose ligante (PALATNIK-DE-SOUSA, CB et al., 1995), a qual induz uma resposta predominantemente humoral. Estudos clínicos de fase III, demonstraram eficácia de 76%. Esta vacina não teve seu registro aprovado no MAPA, pois a empresa não cumpriu com as regulamentações técnicas.

Uma das principais preocupações dos Programas de Controle de LV é a distinção de cães imunizados, daqueles naturalmente infectados, na realização de inquéritos sorológicos caninos para identificar a prevalência da infecção canina por *L. infantum chagasi*. Os métodos atualmente empregados nos inquéritos sorológicos caninos são o teste imunocromatográfico com antígeno recombinante rK28, TR-DPP®, e o ELISA com antígeno de *L. major*-like (MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE, 2014). Segundo Oliveira et al., (2009), alguns problemas relacionados na diferenciação de cães infectados de vacinados, incluem resultados falsos positivos devido à reação cruzada sorológica com outros agentes infecciosos, e falsos negativos de resultados obtidos em cães assintomáticos, mas infectados por *Leishmania*. Entretanto, Testasica et al., (2014), afirmam que amostras de soro de cães vacinados com Leish-Tec® não reagem contra antígeno rK28 e promastigotas de *Leishmania* por IFI, podendo haver distinção de cães vacinados daqueles infectados. Este é uma das poucas publicações que demonstram resultado de distinção sorológica entre cães. Portanto, necessitam-se mais estudos para confirmar esses dados.

Além da problemática da distinção de cães naturalmente infectados, daqueles vacinados, tem-se ainda a necessidade de avaliar, se alguma intervenção poderia alterar esta distinção, o uso de coleiras impregnadas com deltametrina ou então a

utilização de outras vacinas contra *Leishmania*, bem como a combinação destas intervenções.

Baseados nos dados da literaturas e em decorrência de poucos dados na literatura e na possibilidade de usarmos amostras de uma coorte de cães que sofreram diferentes intervenções de controle, provenientes de um município (Panorama-SP) que tem transmissão moderada de LV, buscamos definir se métodos atualmente empregados em inquéritos sorológicos (TR-DPP® e ELISA major-like), e novas metodologias sorológicas (ELISA LESA) e métodos moleculares poderiam distinguir cães imunizados daqueles naturalmente infectados.

2 - OBJETIVO

Avaliar se por meio de técnicas sorológicas: TR-DPP®, ELISA *L. major-like*, ELISA LESA e moleculares, PCR convencional - Reação em cadeia da polimerase, a possibilidade de distinção entre cães imunizados e naturalmente infectados, em amostras de soros procedentes de uma coorte de cães imunizados e não imunizados com duas diferentes vacinas e com ou sem coleira impregnada com deltametrina, provenientes da cidade de Panorama-SP.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - DELINEAMENTO E LOCAL DO ESTUDO

Entre 2012 e 2014, Lopes et al., (2018) realizaram um estudo de coorte de intervenção, que avaliou diferentes ferramentas para o controle da infecção por *L. infantum chagasi* em Panorama-SP, que tinha transmissão humana e canina, com presença do vetor transmissor, sendo o município classificado como de transmissão moderada. De acordo com o último Boletim Epidemiológico Paulista - BEPA 2019 (HIRAMOTO, et al. 2019), o município é classificado com transmissão moderada sendo um lugar prioritário para as ações de vigilância epidemiológica. A atual incidência de LVC é 25,61%.

Panorama está localizado no Oeste do Estado de São Paulo (S21°21'00" e O51°51'36") com área de 356 km² e população de 14.583 habitantes (LOPES et al., 2018). O estudo de Lopes et al., (2018) é o cerne da presente pesquisa.

3.2 - AMOSTRAS, PERÍODO DE COLETA E LOCAL DE EXPERIMENTO

Foram utilizadas 600 amostras obtidas de 200 cães do repositório biológico do estudo previamente realizado na cidade de Panorama (LOPES et al., 2018), aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (protocolo: 2370/ 2011). A coleta de amostras foi dividida por áreas/regiões do município com o auxílio dos profissionais técnicos de saúde. Durante o referido estudo, foram colhidas amostras em intervalos definidos, como se segue.

1º tempo (-1 a 0): foi subdividido em -1: amostras foram triadas através do TR-DPP® para distinguir cães negativos de cães positivos; 0: após 48 horas, 200 amostras de cães negativos foram divididas em seis grupos, de acordo com as intervenções implementadas no quadro 1 (p. 26).

2º tempo, 200 amostras coletadas após 180 dias das intervenções.

3º tempo, 200 amostras coletadas após 360 dias das intervenções.

As amostras foram gentilmente cedidas para a realização desse projeto, pelo prof. Dr. Rodrigo Martins Soares e encontravam-se armazenadas no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo – IMT/USP. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia, no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo e no laboratório de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz.

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética do Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – CEUA 1429/2019/FMUSP, em 2019 (8.1 CERTIFICADO CEUA, p. 66).

3.3 - CATEGORIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram categorizadas por grupos conforme o quadro a seguir:

Quadro 1: Distribuição dos grupos de cães provenientes do município de Panorama-SP, de acordo com as intervenções realizadas.

GRUPO DE CÃES		N
G1	GRUPO CONTROLE, SEM INTERVENÇÃO: cães que não utilizaram as coleiras inseticidas e não foram vacinados.	28
G2	GRUPO COLEIRA (Scalibor®, MSD Animal Health): cães que apenas utilizaram a coleira impregnada com deltametrina, trocadas a cada quatro meses.	30
G3	GRUPO LEISHMUNE®: cães imunizados com a vacina Leishmune®. (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias).	37
G4	GRUPO LEISH-TECH®: cães imunizados com a vacina Leish-tech®. (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias).	36
G5	GRUPO LEISHMUNE® + COLEIRA: cães imunizados com a vacina Leishmune e portando coleira (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias).	39
G6	GRUPO LEISH-TECH® + COLEIRA: cães imunizados com a vacina Leish-tech® e portando coleira (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias).	30

3.4 - MÉTODOS LABORATORIAIS

3.4.1 - TESTES SOROLÓGICOS

3.4.1.2 - TR-DPP®

Realizou-se o teste seguindo-se as recomendações do fabricante (DPP® Leishmaniose Canina - Bio-Manguinhos/Fiocruz). Inicialmente, cada suporte do teste foi identificado pelo número de cada amostra. A seguir, as amostras foram processadas para detecção de anticorpos. Brevemente, no poço 1, foram adicionados 5µL da amostra de soro e a seguir, 2 gotas da solução tampão. Após 5 minutos, foram adicionadas 4 gotas de tampão de corrida no poço 2. Após 10 minutos, em temperatura ambiente, fez-se a leitura do teste.

O resultado foi considerado reativo se houve aparecimento de duas bandas, controle e amostra; não reativo, se somente a banda controle estava presente. O resultado foi considerado inválido com a presença apenas da banda teste ou de nenhuma das bandas. Quando o teste foi inválido, foi feita nova reação.

3.4.1.3 - ELISA *LEISHMANIA MAJOR-LIKE*

O teste ELISA com antígeno total de *L. major-like* foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante (Leishmaniose Canina - Bio-Manguinhos/Fiocruz || Inovação em saúde || Vacinas, kits para diagnósticos e biofármacos). Foram utilizados 100 µL de cada amostra, diluídos a 1/100 e incubados a 37 °C por 30 minutos. Após isso a placa foi lavada 6 vezes, com tampão de lavagem, 200 µL/poço. O conjugado foi diluído 1/1000 e foram distribuídos 100 µL dessa solução em cada poço. Após incubação a 37 °C, por 30 minutos, a placa foi submetida a mais um ciclo de lavagem igual ao anterior. A reação foi revelada com 100 µL por poço da solução cromógena de TMB/ H₂O₂. Incubou-se em temperatura ambiente, protegido da luz, durante 30 minutos. A reação foi bloqueada pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 2M. Foi feita leitura da reação, em espectrofotômetro de luz, filtro 450 nm (leitor de ELISA Labsystems Multiskan MS, UNISCIENCE). Para o teste ser válido, o controle positivo devia ter densidade óptica (DO) maior ou igual a 0,500 e o controle negativo, maior que 0,050 e menor que 0,120.

O *cut-off* ou ponto de corte foi definido pela média dos controles negativos multiplicado por 2. Valores em torno do *cut-off* e da Faixa Cinza (FC) foram considerados inconclusivos.

3.4.1.4 - TESTE SOROLÓGICO ELISA-LESA

Ensaio imunoenzimático de acordo com Pinedo-Cancino et al., (2016). Inicialmente foi preparado o *Leishmania Excreted Secreted Antigen* - LESA, obtido de cultura *in vitro* da CEPA (MHOM/1972/LD) de *L. infantum chagasi* cedida pela Dra. Camila Aparecida de Carvalho (IMT-USP).

O antígeno excretado/secretado de *L. infantum chagasi* foi obtido a partir do 5º dia de cultivo. Promastigotas foram coletadas, lavadas 2 vezes em PBS e centrifugadas a 1147 G, por 12 minutos a 4°C. Após a segunda lavagem, os parasitos

foram quantificados em câmara de Neubauer, e 5×10^8 parasitas/mL foram ressuspenso em meio RPMI-1640 (Sigma) e incubados por 24 horas a 26°C. Posteriormente foram centrifugados novamente a 1147 G por 12 minutos, a 4°C, sendo o sobrenadante coletado e armazenado à temperatura de -70°C, até o momento de uso.

A concentração ideal do antígeno foi obtida por meio de titulação empregando 8 amostras de soros conhecidos, sendo 5 de cães com leishmaniose visceral, com baixa (1), média (2) e alta reatividade (3) para a sorologia convencional, e 3 amostras de cães saudáveis. O antígeno LESA foi empregado nas diluições 1/5 a 1/1280, sendo que a diluição escolhida foi de 1:5, que permitiu melhor discriminação entre os soros de cães positivos e negativos.

Para a realização do ELISA-LESA na condição padronizada, a placa foi sensibilizada com 50ul de antígeno LESA diluído 1/5 em tampão carbonato e incubada a 4°C, *overnight* (18h). Após esse período, a placa foi lavada uma vez com 200 µL de PBS, bloqueada com 100 µL de PBST leite 5% e incubada à temperatura ambiente por 30 min. As amostras de soros, diluídas a 1/200, foram distribuídas nos poços (50 µL) e incubadas a 37°C por 60 min. Após a incubação, a placa foi lavada 6 vezes com PBST e incubada com 50ul por poço de conjugado anti-IgG peroxidase (Sigma) de cão, diluído 1/8000 em PBS. Posteriormente a placa foi incubada a 37°C, por 60 minutos. Após a incubação, a placa foi lavada conforme descrito anteriormente. A reação foi revelada com 50ul por poço da solução cromógena de OPD/H₂O₂ e incubada a 37°C, por 30 minutos. A reação foi parada pela adição de 25 µL de HCl 4N. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro, por absorbância em filtro 492 nm (leitor de ELISA Labsystems Multiskan MS, UNISCIENCE).

Os valores de *cut-off* (limiar de reatividade) foram estabelecidos empregando a curva ROC (Curva Característica de Operação do Receptor), que foi construída a partir dos valores das absorbâncias obtidas no teste ELISA-LESA, utilizando-se 24 amostras de cães positivos para LVC (com infecção por *L. infantum chagasi*) e 25 de cães negativos (saudáveis).

3.4.2 - TESTE MOLECULAR, REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE CONVENCIONAL, *Polimerase Chain Reaction* – PCR CONVENCIONAL E SEQUENCIAMENTO

3.4.2.1 - DNA DAS AMOSTRAS E CONTROLES

Amostras de DNA de linfonodo dos cães foram obtidas utilizando o kit de extração Qiamp DNA Mini Kit 250 (Qiagen/Alemanha), identificadas e armazenadas a -20 °C até o presente estudo.

Controles positivos de *L. infantum chagasi* foram aliquotados em 50 µL da mesma cultura utilizada no teste ELISA-LESA (item 3.4.1.4) e submetidos à amplificação de acordo com a padronização desse teste.

3.4.2.2 - PADRONIZAÇÃO DE PCR CONVENCIONAL

O gene alvo foi kDNA. Utilizou-se os seguintes oligoiniciadores: RV1: CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG e RV2: CCACCTGGCCTATTTTACACCA que são descritos como específicos para *Leishmania infantum*. As condições do procedimento estão descritas na tabela 1 (p. 32), de acordo com Gomes et al., (2007).

3.4.2.3 - SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS

3.4.2.3.1 - SEQUENCIAMENTO POR RV1 E RV2

3.4.2.3.1.1 - PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR CONVENCIONAL

Utilizou-se kit de purificação QIAquick PCR purification (Qiagen, Suíça). Fez-se a ligação do produto amplificado na coluna, utilizando-se 5 volumes de tampão para cada um volume de amostra a ser purificada e centrifugou-se a 18928 G por 1 minuto. Após isso, o centrifugado foi descartado. Aplicou-se na coluna, 750 µl de tampão e novamente centrifugou-se a 18928 G, por 1 minuto. Descartou-se o filtrado e foi feita uma nova centrifugação nos mesmos parâmetros para que fosse certificado de que não haveria resíduos do tampão. Para eluição, foram usados 30 µl de tampão diretamente na coluna, incubado por 1 minuto e centrifugado a 18928 G por 1 minuto.

3.4.2.3.1.2 - QUANTIFICAÇÃO EM GEL DE AGAROSE

O produto de PCR purificado foi analisado em gel de agarose 2% corado com 0,5µl de GelRed. Foi utilizado o *Low Mass Ladder* (Invitrogen, EUA) para determinação do peso molecular.

3.4.2.3.1.3 - REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Utilizou-se 2 µl de BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, EUA), 1 µl de tampão de sequenciamento, 1 µl de primer (RV1 ou RV2) a 5 pmol/µl, 3 µl de água livre de DNase/RNase e 3 µl de produto de PCR purificado. Foram realizados o sequenciamento dos oligonucleotídeos (RV1 e RV2). Para a ciclagem, padronizou-se o 1º ciclo a 95°C em 5 minutos, o 2º ciclo a 95°C em 30 segundos, 3º ciclo a 58°C em 30 segundos, 4º ciclo a 72°C em 30 segundos e o 5º ciclo a 72°C em 5 minutos.

3.4.2.3.1.4 - PRECIPITAÇÃO

O produto amplificado foi transferido para uma placa de 96 poços, utilizando-se 26 µl por poço, de uma solução composta de 25 µl de etanol 100% e 1 µl de acetato de sódio 3,0M pH 4,6. A solução foi preparada no momento de uso e incubada 15 minutos antes de iniciar a precipitação. Após adicionar à solução de precipitação, a placa foi selada com adesivo óptico para placas, as amostras foram homogeneizadas em vórtex, incubadas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 minutos e centrifugadas a 2000 g por 45 minutos a 20°C. Após isso, foi retirado o selante da placa, a qual foi invertida e centrifugada a 150 G, novamente invertida em papel absorvente por 1 minuto a 20°C para que a solução utilizada fosse completamente removida dos poços. Adicionou-se 150 µl de etanol 70% em cada poço, a placa foi selada novamente e centrifugada a 2000 G por 15 minutos, a 20°C. Realizou-se novamente a remoção do selante e a inversão da placa centrifugação a 150 G invertida em papel absorvente, por 1 minuto. Manteve-se a placa em temperatura ambiente por 5 minutos ao abrigo da luz para que os poços pudessem secar, após seca, foram adicionados 10 µl de formamida e a placa foi selada novamente.

3.4.2.3.1.5 - DESNATURAÇÃO

Realizou-se esse processo para que as fitas duplas restantes se separassem e possibilitassem a leitura do sequenciador. Assim, a placa foi colocada em termociclador em um ciclo de 5 minutos a 95°C. Após esse tempo, a placa foi imersa em gelo, onde permaneceu por 2 minutos.

3.4.2.3.1.6 - CORRIDA

Realizou-se a leitura do sequenciamento no sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA).

3.4.2.3.1.7 - ANÁLISE DE DADOS GERADOS PELO SEQUENCIAMENTO

Após o término da corrida, as amostras foram avaliadas no software do equipamento para análise posterior no CLC Genomics Workbench (Applied Biosystems, EUA), no qual todas as sequencias foram comparadas com os genótipos anteriormente depositados no GenBank. Todas possuíam maior similaridade com o genótipo, descrito em trabalhos anteriores, logo, este genótipo foi usado como padrão de comparação, ou seja, sem mutação. Para realizar o alinhamento, as amostras comparadas com o genótipo B para pontuar as mutações. Para evitar falsa identificação de mutações, avaliou-se cada alinhamento, eliminando a possibilidade de mutações causadas pelo arraste de uma base nitrogenada, erro passível de ocorrer no momento do sequenciamento.

Tabela 1: Descrição dos iniciadores de kDNA PCR convencional, peso molecular do fragmento amplificado, artigo de referência e condições da kDNA PCR convencional RV1 e RV2.

Gene alvo	Iniciadores	Pm do fragmento amplificado	Artigo de referência	Concentração e volume da amostra	Concentração dos reagentes (volume final da reação = 20 µL)	Temperaturas (°C) de ciclagem e tempo de ciclagem (s)	Número de ciclos
kDNA de <i>Leishmania infantum chagasi</i>	RV1: CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG RV2: CCACCTGGCCTATTTTACACCA	145 pares de base	Gomes et al. 2007	100 ng; 4 µL	H ₂ O deionizada: 9,46 µL PCR Buffer [5x]: 4 µL DNTPs (10Mm): 0,4 µL MgCl ₂ 25 mM: 1,6 µL Primer RV1 (40 µM): 0,12 µL Primer RV2 (40 µM): 0,12 µL Taq DNA polimerase 5 (U/µL): 0,3 µL	Desnaturação inicial: 95°C; 300 s. Desnaturação: 95°C; 30 s. Anelamento: 58°C; 30 s. Extensão: 72°C; 30 s. Extensão final: 72°C; 300 s.	35

Legenda: ng=nanogramas; °C=graus centígrados; s=segundos.

3.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando os programas GraphPad Prism version 5.00 para Windows (GraphPad Software) e MedCalc® (MedCalc statistical software - free trial available). Para todos os testes, considerou-se nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

O cut-off do ELISA-LESA foi estabelecido empregando a curva ROC (receiver operating characteristic).

A concordância entre a positividade obtida pelas técnicas empregadas (duas a duas) foi calculada empregando o índice *Kappa* e interpretada de acordo com Landis; Koch, (1977), concordância quase perfeita; 0.80-0.61, substancial; 0.60-0.41, moderada; 0.40-0.21, razoável e 0.20-0.00, mínima.

A comparação entre as coortes de animais e suas intervenções nos seus tempos apresentados no estudo foi realizada empregando-se o teste de qui-quadrado.

O teste Q de Cochran foi utilizado para verificar se três ou mais conjuntos correspondentes de frequências ou proporções diferiam entre si significativamente. No caso, para cada teste, verificou-se se haveria diferença significativa entre os tempos e para cada tempo, se havia diferença significativa entre os testes. O teste Q foi aplicado para grupo de animal e no total de animais.

Os valores de positividade foram apresentados com os respectivos intervalos de confiança de 95% de probabilidade. Para todos os testes, considerou-se nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

4 - RESULTADOS

4.1 - TITULAÇÃO, ESPECIFICIDADE E DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DO TESTE DE REATIVIDADE, TESTE ELISA-LESA

A figura 3 apresenta o gráfico de titulação do antígeno LESA. A diluição 1:5 foi a que melhor distinguiu a absorbância entre valores reativos e não reativos.

Figura 3: Titulação do antígeno LESA (lote 2), por ELISA indireto, utilizando amostras de soro de cães positivos (diferentes níveis reatividade, anteriormente determinados por ELISA usando antígeno total de *Leishmania major-like*) e negativos para leishmaniose.

Na figura 4, estão a curva ROC e as absorbâncias das amostras positivas e negativas empregadas na sua construção, obtendo-se um *cut-off* de 0,40. Utilizando-se amostras sabidamente positivas e negativas para *Leishmania*, obtivemos sensibilidade e especificidade de 100%, com antígeno excretado e secretado de *Leishmania infantum*.

Figura 4: Curva ROC e distribuição dos resultados de absorbância (Abs 492nm) dos soros(IgG) de cães submetidos a ELISA indireto com antígeno LESA. A curva ROC foi construída com 24 amostras dos soros de cães positivos para leishmaniose visceral e 25 negativos.

ROC – Receiver Operating Characteristic.

4.2 - TESTE QUALITATIVO DE PCR CONVENCIONAL

Das 600 amostras de todos os tempos analisados, 34 amostras amplificaram, correspondente a 145 pares de bases, destas, 20 foram do 1º T, 4 do 2º T e 10 do 3º T.

Em relação aos grupos de intervenção foi detectado DNA de *Leishmania* em quatro amostras do G1 (Figura 5), em cinco amostras do G2 (Figura 6), em cinco amostras do G3 (Figura 7), em três amostras do G4 (Figura 8), em 12 amostras do G5 (Figura 9) e em cinco amostras do G6 (Figura 10)

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 2% de amostras amplificadas por PCR convencional, utilizando os oligoiniciadores RV1 e RV2 direcionados para porção do minicírculo do KDNA de *L. infantum chagasi*. DNA de cães do G1. Amostras positivas 3, 6, 10 e 13, amplificaram à altura de 145 pb. CP + (controle positivo), CN - (controle negativo), pb (pares de base).

Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 2% de amostras amplificadas por PCR convencional, utilizando os oligoiniciadores RV1 e RV2 direcionados para porção do minicírculo do KDNA de *L. infantum chagasi*. DNA de cães do G2. Amostras positivas

(continuação da figura 6) 2, 5, 7, 9 e 15 amplificaram à altura de 145 pb. CP + (controle positivo), CN - (controle negativo), pb (pares de base).

Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 2% de amostras amplificadas por PCR convencional, utilizando os oligoiniciadores RV1 e RV2 direcionados para porção do minicírculo do KDNA de *L. infantum chagasi*. DNA de cães do G3. Amostras positivas 2, 5, 8, 11 e 15 amplificaram à altura de 145 pb. CP + (controle positivo), CN - (controle negativo), pb (pares de base).

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 2% de amostras amplificadas por PCR convencional, utilizando os oligoiniciadores RV1 e RV2 direcionados para porção do minicírculo do KDNA de *L. infantum chagasi*. DNA de cães do G4. Amostras positivas 8, 9 e 14 amplificaram à altura de 145 pb. CP + (controle positivo), CN - (controle negativo), pb (pares de base).

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 2% de amostras amplificadas por PCR convencional, utilizando os oligoiniciadores RV1 e RV2 direcionados para porção do minicírculo do KDNA de *L. infantum chagasi*. DNA de cães do G5. Amostras positivas 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 14, 15 e 16 amplificaram à altura de 145 pb. CP + (controle positivo), CN - (controle negativo), pb (pares de base).

Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 2% de amostras amplificadas por PCR convencional, utilizando os oligoiniciadores RV1 e RV2 direcionados para porção do minicírculo do KDNA de *L. infantum chagasi*. DNA de cães do G6. Amostras positivas 6, 7, 12, 14 e 15 amplificaram à altura de 145 pb. CP + (controle positivo), CN - (controle negativo), pb (pares de base).

Analisando-se as amostras positivas dos vários grupos de intervenção (G1 a G6) em relação ao tempo da coleta (1^o, 2^o e 3^o tempo) observamos: G1 = 2 amostras positivas no 1^o T, 0 amostras positivas no 2^o T e 2 amostras positivas no 3^o T. G2 = 3

amostras positivas no 1º T, 0 amostras positivas no 2º T e 2 amostras positivas no 3º T. G3 = 3 amostras positivas no 1º T, 2 amostras positivas no 2º T e 0 amostras positivas no 3º T. G4 = 1 amostra positiva no 1º T, 1 amostra positiva no 2º T e 1 amostra positiva no 3º T. G5 = 9 amostras positivas no 1º T, 0 amostras positivas no 2º T e 3 amostras positivas no 3º T. Grupo 6 = 2 amostras positivas no 1º T, 1 amostra positiva no 2º T e 2 amostras positivas no 3º T (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das amostras positiva na PCR convencional em relação aos grupos de intervenção e tempo de coleta de amostras. 1º T: antes da intervenção. 2º T: 180 dias após a intervenção. 3º T: 360 dias após a intervenção. G1: Cães que não utilizaram as coleiras inseticidas e não foram vacinados; G2: Cães que utilizaram a coleira impregnada com deltametrina, trocadas a cada quatro meses; G3: Cães imunizados pela vacina Leishmune® (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); G4: Cães imunizados pela vacina Leish-tech® (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); G5: Cães imunizados pela vacina Leishmune®, portando coleira; G6: Cães imunizados pela vacina Leish-tech®, portando coleira.

Grupos de animais	1º T	2º T	3º T
Controle, sem intervenção: G1 - n = 28	2	0	2
Coleira: G2 - n = 30	3	0	2
Leishmune®: G3 - n = 37	3	2	0
Leish-tech®: G4 - n = 36	1	1	1
Leishmune® + coleira: G5 - n = 39	9	0	3
Leish-tech® + coleira: G6 - n = 30	2	1	2

Amostras positivas na PCR foram submetidas a sequenciamento para corroborar se a espécie de *Leishmania* detectada seria de *L. (L.) infantum chagasi* (Figura 11). Todas as 34 amostras positivas por PCR convencional, usando os oligoiniciadores RV1 e (continuação Figura 11) RV2 foram sequenciadas e analisadas no SANGER, sendo identificadas como *Leishmania infantum chagasi*.

4.3 - POSITIVIDADE DO TR-DPP® + ELISA *L. MAJOR-LIKE*, ELISA-LESA E PCR CONVENCIONAL NOS SEIS GRUPOS DE ANIMAIS EM FUNÇÃO DO TEMPO AVALIADO.

Embora as 600 amostras dos 200 cães analisados tenham sido analisadas pelos testes DPP e ELISA *L. major-like*, os resultados estão apresentados seguindo-se o algoritmo do Ministério da Saúde (MS) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (NOTA TÉCNICA CONJUNTA Nº 1 PARA TRIAGEM DE LVC, 2011) os quais consideram positivas as amostras reagentes por ambos os testes. Nas tabelas a seguir encontram-se os valores de positividade e respectivos intervalos de confiança de 95% de probabilidade obtidos na avaliação dos seis grupos de animais, pelos testes TR-DPP® e ELISA *L. major-like* (tabela 3), ELISA-LESA (tabela 4) e PCR convencional (tabela 5).

Observa-se que houve um aumento significativo na positividade pelo teste algoritmo TR-DPP® + ELISA *L. major-like*, no grupo de animais sem intervenção (G1), entre o 1º e 3º T (teste Q de Cochran, $p = 0,042$) e no total de cães (teste Q de Cochran, $p = 0,028$), entre o 1º e 2º T. Não houve diferença significativa entre os três tempos nos demais grupos (teste Q de Cochran, $p > 0,05$) ou entre os grupos de animais (teste Qui-quadrado, $p > 0,05$).

Tabela 3: Positividade e intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) de TR-DPP® + ELISA *L. major*-like dos três tempos avaliados de acordo com o grupo de animais.

Grupos de animais	TR DPP + ELISA <i>L. major</i> -like			p*
	1º T	2º T	3º T	
Controle, sem intervenção: G1 - n = 28	0,00% 0,00-13,17%	10,71% 2,21-31,31%	17,86% 5,80-41,67%	0,042 1º T ≠ 3º T
Coleira: G2 - n = 30	6,67% 0,81-24,08%	13,33% 3,63-34,14%	3,33% 0,08-18,57%	0,247
Leishmune®: G3 - n = 37	5,41% 0,65-19,53%	10,81% 2,95-27,68%	5,41% 0,65-19,53%	0,607
Leish-tech®: G4 - n = 36	2,78% 0,07-15,48%	11,11% 3,03-28,45%	16,67% 6,12-36,28%	0,093
Leishmune® + coleira: G5 - n = 39	2,56% 0,06-14,29%	12,82% 4,16-29,92%	10,26% 2,79-26,26%	0,273
Leish-tech® + coleira: G6 - n = 30	6,67% 0,81-24,08%	3,33% 0,08-18,57%	3,33% 0,08-18,57%	0,779
Total - n = 200	4,00% 1,73-7,88%	10,50% 6,50-16,05%	9,50% 5,72-14,83%	0,028 1º T ≠ 2º T
Comparação entre os grupos (G1 a G6) p**	0,7281	0,8296	0,1661	

(continuação tabela 3) N - número de amostras. T - tempo. G - grupo. p* - teste Q de Cochran. p** - Teste qui-quadrado.

Quando analisamos a soro reatividade, utilizando-se o LESA, observamos que no grupo de animais encoleirados e imunizados com Leishmune® (G5) houve um aumento significativo na positividade pelo teste ELISA-LESA (teste Q de Cochran, p = 0,045) e considerando o total de cães (teste Q de Cochran, p = 0,006), entre o 1º e 2º T e o 1º e 3º T. Não houve diferença significativa entre os três tempos nos demais grupos (teste Q de Cochran, p > 0,05). No 1º T o grupo de cães imunizados por Leish-tech® (G4) apresentou positividade significativamente mais elevada que os demais grupos (teste Qui-quadrado, p = 0,049) (Tabela 4).

Tabela 4: Positividade e intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) de ELISA-LESA nos três tempos avaliados de acordo com o grupo de animais.

Grupos de animais	ELISA LESA			p*
	1º T	2º T	3º T	
Controle, sem intervenção: G1 - n = 28	3,57% 0,09-18,90%	7,14% 0,86-25,80%	7,14% 0,86-25,80%	0,717
Coleira: G2 - n = 30	3,33% 0,08-18,57%	6,67% 0,81-24,08%	6,67% 0,81-24,08%	0,779
Leishmune®: G3 - n = 37	5,41% 0,65-19,53%	8,11% 1,67-23,69%	10,81% 2,95-27,68%	0,687
Leish-tech®: G4 - n = 36	19,44% 7,82-40,06%	25,00% 11,43-47,46%	30,56% 15,25-54,67%	0,472
Leishmune® + coleira: G5 - n = 39	2,56% 0,06-14,26%	15,38% 5,65-33,49%	17,95% 7,22-36,98%	0,045
Leish-tech® + coleira: G6 - n = 30	6,67% 0,81-24,08%	23,33% 9,38-48,08%	16,67% 5,41-38,89%	0,121
Total - n = 200	7,00% 3,83-11,74%	14,50% 9,71-20,82%	15,50% 10,53-22,00%	0,006 1º T ≠ 2º T 1º T ≠ 3º T
Comparação entre os grupos (G1 a G6) p**	0,049	0,1074	0,0661	

N - número de amostras. T - tempo. G - grupo. p* - teste Q de Cochran. p** - Teste qui-quadrado.

Tabela 5: Positividade e intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) de PCR convencional nos três tempos avaliados de acordo com o grupo de animais.

Grupos de animais	PCR CONVENCIONAL			p*
	1º T	2º T	3º T	
Controle, sem intervenção: G1 – n = 28	7,14% 0,86-25,80%	0,00% 0,00-13,17%	7,14% 0,86-25,80%	0,368
Coleira: G2 – n = 30	10,00% 2,06-29,22%	0,00% 0,00-12,30%	6,67% 0,81-24,08%	0,097
Leishmune®: G3 – n = 37	8,11% 1,67-23,69%	5,40% 0,65-19,53%	0,00% 0,00-9,97%	0,247
Leish-tech®: G4 – n = 36	2,78% 0,07-15,48%	2,78% 0,07-15,48%	2,78% 0,07-15,48%	1,000
Leishmune® + coleira: G5 – n = 39	23,08% 10,55-43,81%	0,00% 0,00-9,46%	7,69% 1,59-22,48%	0,003 1º T ≠ 2º T
Leish-tech® + coleira: G6 – n = 30	6,67% 0,81-24,08%	3,33% 0,08-18,57%	6,67% 0,81-24,08%	0,779
Total - n = 200	10,00% 6,11-15,44%	2,00% 0,54-5,12%	5,00% 2,40-9,19%	0,001 1º T ≠ 2º T
Comparação entre os grupos (G1 a G6) p**	0,068	0,4730	0,6176	

N - número de amostras. T - tempo. G - grupo. p* - teste Q de Cochran. p** - Teste qui-quadrado.

As figuras 12, 13 e 14 apresentam as porcentagens de positividade das amostras dos seis grupos de cães estudados, empregando os testes TR-DPP® + ELISA *L. major*-like, ELISA-LESA e PCR convencional, nos tempos 1º (figura 12), 2º (figura 13) e 3º (figura 14).

A análise dos resultados do 1º T mostrou maior positividade do teste ELISA-LESA quando comparada ao TR-DPP® + ELISA *L. major*-like e ao método PCR convencional (teste Q de Cochran, p = 0,006), no grupo de cães imunizados por Leish-Tec® (G4) e maior positividade de PCR convencional quando comparada com TR-

DPP® + ELISA *L. major*-like e com o teste ELISA-LESA (teste Q de Cochran, $p = 0,002$), no grupo dos cães encoleirados e vacinados por Leishmune® (G5). Não foi observada diferença significativa entre os testes nos demais grupos de animais.

Figura 12: Positividade dos testes TR-DPP® + ELISA *L. major*-like, ELISA-LESA e PCR convencional na avaliação das 200 amostras de cães, nos diferentes grupos, no 1º T.

G1: Cães que não utilizaram as coleiras inseticidas e não foram vacinados; G2: Cães que utilizaram a coleira impregnada com deltametrina, trocadas a cada quatro meses; G3: Cães imunizados pela vacina Leishmune® (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); G4: Cães imunizados pela vacina Leish-tech® (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); (continuação figura 12) G5: Cães imunizados pela vacina Leishmune®, portando coleira; G6: Cães imunizados pela vacina Leish-tech®, portando coleira.

Teste Q de Cochran - G1 - $p = 0,368$; G2 - $p = 0,607$; G3 - $p = 0,867$; G4 - $p = 0,006$ (DPP + ELISA- *L. major*-like $\neq$ ELISA LESA e PCR convencional $\neq$ ELISA LESA); G5 - $p = 0,002$ (DPP + ELISA- *L. major*-like $\neq$ PCR convencional e ELISA LESA $\neq$ PCR convencional); G6 - $p = 1,000$.

No 2º T, observou-se maior positividade do teste ELISA-LESA quando comparada à da PCR convencional, no grupo de cães imunizados por Leish-Tec® (G4) (teste Q de Cochran, $p = 0,0023$) e no grupo de cães encoleirados e vacinados por Leishmune® (G5) (teste Q de Cochran, $p = 0,0032$). No grupo de animais encoleirados e imunizados por Leish-Tec® (G6) o ELISA-LESA apresentou maior positividade que TR-DPP® + ELISA- *L. major*-like e PCR convencional ($p = 0,0018$). Não houve diferença significativa entre os testes nos demais grupos de animais.

Figura 13: Positividade dos testes TR-DPP® + ELISA *L. major*-like, ELISA-LESA e PCR convencional na avaliação das 200 amostras de cães, nos diferentes grupos, no 2º T.

G1: Cães que não utilizaram as coleiras inseticidas e não foram vacinados; G2: Cães que utilizaram a coleira impregnada com deltametrina, trocadas a cada quatro meses; G3: Cães imunizados pela vacina Leishmune® (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); G4: Cães imunizados pela vacina Leish-tech® (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); (continuação figura 13) G5: Cães imunizados pela vacina Leishmune®, portando coleira; G6: Cães imunizados pela vacina Leish-tech®, portando coleira.

Teste Q de Cochran - G1 - $p = 0,097$; G2 - $p = 0,135$; G3 - $p = 0,651$; G4 - $p = 0,023$ (ELISA LESa ≠ PCR convencional); G5 - $p = 0,032$ (ELISA LESa ≠ PCR convencional); G6 - $p = 0,018$ (DPP + ELISA- *L. major*-like ≠ ELISA LESa e PCR convencional ≠ ELISA LESa).

Em relação ao 3º T, ELISA-LESA apresentou maior positividade quando comparada à PCR convencional no grupo de cães imunizados por Leishmune® (G3) (teste Q de Cochran $p = 0,050$) e no grupo de cães imunizados por Leish-Tec® (G4). Nos demais grupos não houve diferença significativa na positividade entre os testes.

Figura 14: Positividade dos testes TR-DPP® + ELISA *L. major-like*, ELISA-LESA e PCR convencional na avaliação das 200 amostras de cães, nos diferentes grupos, no 3º T.

G1: Cães que não utilizaram as coleiras inseticidas e não foram vacinados; G2: Cães que utilizaram a coleira impregnada com deltametrina, trocadas a cada quatro meses; G3: Cães imunizados pela vacina Leishmune® (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); G4: Cães imunizados pela vacina Leish-tech® (1ª, 2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); G5: Cães imunizados pela vacina Leishmune®, portando coleira; G6: Cães imunizados pela vacina Leish-tech®, portando coleira.

(continuação figura 14) Teste Q de Cochran - G1 - $p = 0,276$; G2 - $p = 0,779$; G3 - $p = 0,050$ (ELISA LESA $\neq$ PCR convencional); G4 - $p = 0,002$ (ELISA LESA $\neq$ PCR convencional); G5 - $p = 0,307$; G6 - $p = 0,115$.

A figura 15 mostra o percentual de positividade das amostras de soro dos 200 cães nos testes TR-DPP® + ELISA *L. major-like*, ELISA-LESA e PCR convencional,

nos três tempos avaliados. A PCR convencional apresentou menor positividade quando comparada ao TR-DPP® + ELISA *L. major*-like e ELISA-LESA (teste Q de Cochran, $p < 0,001$), no 2º T e ao ELISA-LESA (teste Q de Cochran, $p = 0,001$), no 3ºT.

Figura 15: Positividade dos testes TR-DPP® + ELISA *L. major*-like, ELISA-LESA e PCR convencional na avaliação das 600 amostras de 200 cães, nos três tempos. Teste Q de Cochran – 1º T – $p = 0,058$; 2º T – $p < 0,001$ (DPP + ELISA- *L. major*-like $\neq$ PCR convencional e ELISA LESAs $\neq$ PCR convencional); 3º T – $p = 0,001$ (ELISA LESAs $\neq$ PCR convencional).

Para avaliar a concordância entre os resultados dos testes empregados, calculou-se o índice *Kappa* entre pares de testes nos três tempos e nos seis grupos de animais avaliados. As tabelas 6, 7 e 8 apresentam os valores de *Kappa* e intervalos de confiança de 95% de probabilidade nas situações em que houve concordância. Índices mais elevados de concordância (substancial) foram observados entre TR-DPP + ELISA *L. major*-like em três comparações (tabela 6). Índice moderado de concordância observou-se entre ELISA-LESA e PCR convencional em uma comparação (tabela 8). Índices médios de concordância (razoável) foram observados entre TR- DPP + ELISA *L. major*-like e ELISA-LESA, TR- DPP + ELISA *L. major*-like e PCR convencional e entre ELISA-LESA e PCR convencional (tabelas 6, 7 e 8).

Concordância mínima foi encontrada entre ELISA-LESA e PCR convencional em duas comparações (tabela 8). Na maioria das comparações não foi observada concordância ($Kappa \leq 0$).

Tabela 6: Concordância entre TR-DPP® + ELISA *L. major*-like e ELISA-LESA.

<i>Kappa</i> (IC95%)	TR- DPP + ELISA <i>L. major</i> -like x ELISA LESA		
	Grupo	Tempo	Concordância
0,781 (0,370-1,000)	G1	2º T	substancial
0,651 (0,021-1,000)	G2	3º T	substancial
0,641 (0,189-1,000)	G3	3º T	substancial
0,352 (-0,006-0,656)	G4	3º T	razoável
0,294 (-0,162-0,750)	G6	3º T	razoável
0,260 (-0,141-0,651)	G5	2º T	razoável
0,213 (-0,252-0,677)	G3	2º T	razoável
0,212 (-0,143-0,566)	G4	1º T	razoável
0,205 (-0,243-0,652)	G1	3º T	razoável

IC 95% intervalo de confiança de 95% de probabilidade.

Tabela 7: Concordância entre TR-DPP® + ELISA *L. major*-like e PCR convencional.

<i>Kappa</i> (IC95%)	DPP + ELISA <i>L. major</i> -like x PCR convencional		
	Grupo	Tempo	Concordância
0,372 (-0,157-0,902)	G4	2º T	razoável
0,250 (-0,154-0,654)	G4	3º T	razoável
0,205 (-0,243-0,652)	G1	3º T	razoável

IC 95% intervalo de confiança de 95% de probabilidade.

Tabela 8: Concordância entre ELISA-LESA e PCR convencional.

<i>Kappa</i> (IC95%)	ELISA LESA x PCR convencional		
	Grupo	Tempo	Concordância
0,464 (-0,165-1,000)	G6	1º T	Moderada
0,358 (-0,206-0,922)	G3	2º T	Razoável
0,328 (-0,068-0,723)	G5	3º T	Razoável
0,212 (-0,143-0,566)	G4	1º T	Razoável
0,211 (-0,236-0,750)	G6	3º T	Razoável
0,161 (-0,121-0,443)	G5	1º T	Mínima
0,122 (-0,099-0,343)	G4	3º T	Mínima

IC 95% intervalo de confiança de 95% de probabilidade.

5 - DISCUSSÃO

Neste trabalho foram utilizadas amostras de soro e de DNA procedentes de uma coorte de cães imunizados e não imunizados com duas diferentes vacinas comerciais, com ou sem uso de coleira impregnada com inseticida, da cidade de Panorama-SP com o objetivo de avaliar a possibilidade de diferenciar cães imunizados de cães naturalmente infectados, empregando métodos laboratoriais.

O Programa de Controle de Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde recomenda a triagem de cães com o TR-DPP® e a confirmação do TR-DPP® positivo empregando o ELISA *L. major*-like (NOTA TÉCNICA CONJUNTA Nº 1 PARA TRIAGEM DE LVC, 2011). Neste estudo, optamos por testar as 600 amostras de todos os tempos analisados por ambos os testes, independentemente do resultado do TR-DPP®. Entretanto, na análise dos resultados, considerou-se o algoritmo recomendado pelo Ministério. Considerando o TR-DPP®, há estudos que relataram diminuição de sensibilidade em cães assintomáticos (47%) em relação aos sintomáticos (98%) e elevada especificidade (96%) (GRIMALDI et al., 2012). Por outro lado, Figueiredo et al., (2018) observaram que embora a performance do teste varie de acordo com a sintomatologia do cão, influencia menos do que o relatado em trabalhos anteriores (sensibilidade de 89% em cães sintomáticos e 75% em assintomáticos). Os autores sugerem a necessidade de confirmar o diagnóstico de LV após triagem com o TR-DPP® (FIGUEIREDO et al., 2018).

O algoritmo do Ministério da Saúde (TR-DPP® + ELISA *L. major*-like) detectou um aumento significativo de positividade no Grupo Controle de cães, sem intervenção (G1), sugerindo que esses animais não protegidos podem ter se infectado no decorrer do estudo. Esse aumento significativo no nível de anticorpos detectados pelo algoritmo do Ministério da Saúde não foi observado nos outros grupos de animais do estudo. Entretanto, no grupo de animais vacinados pela Leish-tech® (G4) observou-se um aumento, que embora não tenha sido significativo, pode indicar que um número menor de animais pode ter apresentado reatividade cruzada, entre os anticorpos induzidos pela vacina e os antígenos empregados. Empregando o algoritmo (DPP + ELISA-*L. major*-like), Paiva de Campos et al., (2016) não observaram sorocorversão dos cães vacinados tanto com a Leishmune®, quanto com a Leish-tec®. Resultados semelhantes foram obtidos por Testasicca et al., (2014) que vacinaram cães com

Leish-Tec®. Por outro lado, empregando os testes DPP e ELISA-*L. major*-like, Marcondes et al., (2013) relataram detecção de cães vacinados pela Leishmune® e Fernandes et al., (2008) obtiveram 30,5% e 30,9% de soroconversão em cães vacinados com Leishmune® e Leish-Tec®, respectivamente, empregando o teste ELISA com antígeno de *L. infantum chagasi*. Esses resultados discrepantes podem ser atribuídos a diferenças na metodologia empregada e aos critérios adotados na triagem e inclusão de cães nos vários estudos (TESTASICCA et al., 2014).

Essa técnica sorológica é o atual teste preconizado pelo Ministério da Saúde como triagem para LVC, o algoritmo (NOTA TÉCNICA CONJUNTA Nº 1 PARA TRIAGEM DE LVC, 2011). Ambos os testes são bastante sensíveis para diagnosticar anticorpos anti-*Leishmania* (ssp), TR-DPP® possui sensibilidade no soro entre 87,5% a 91,7% e ELISA *L. Major*-like 89,7% a 93,1%. (ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, 2012). TR-DPP® possui antígenos recombinantes específicos para anticorpos específicos para *Leishmania* e o teste ELISA é extraído de culturas *in vitro* de *L. major*-like, um antígeno solúvel e purificado, confirmatório do teste imunocromatográfico (NOTA TÉCNICA CONJUNTA Nº 1 PARA TRIAGEM DE LVC, 2011).

Pessoa-e-Silva et al., (2019), utilizaram este mesmo algoritmo do Ministério da Saúde ao compararem diferentes técnicas laboratoriais para detecção de LVC a fim de estabelecer confiabilidade nos diagnósticos, porém, eles separaram o teste imunocromatográfico do ensaio imunoenzimático, independente dos critérios clínicos apresentados, entre TR-DPP® e ELISA *L. major*-like houve maior percentual de concordância, 94,54% e 91,76%, respectivamente, com o índice kappa classificado como moderado, logo, ambos os testes apresentam mais confiabilidade em inquéritos caninos para LVC além de corroborar com o algoritmo do Ministério da Saúde. A concordância entre TR-DPP® e a PCR convencional que utilizaram em Pessoa-e-Silva et al., (2019) foi considerada mínima/ruim, com o índice kappa = 0,162. Salienta-se que eles não utilizaram o mesmo primer o qual foi usado nessa pesquisa em PCR convencional, porém, o alvo foi o mesmo (kDNA) para a espécie do parasito que seria pesquisada.

A concordância e também o elevado nível de sensibilidade e especificidade de TR-DPP® e ELISA *L. major*-like (ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA,

2012) ao comparar com os resultados de Pessoa-e-Silva et al., (2019) com este trabalho, corrobora mais em afirmar que o atual algoritmo de triagem para LVC é um teste eficaz, independente dos cães serem sintomáticos ou assintomáticos.

O grupo que apresentou mais resultados positivos, no 1º T foi o G2 e no 2º T e no 3º T foi o G1 apresentou valores mais elevados. A possibilidade de o *n* de amostras serem positivas em G1 foi por esses animais, ao longo do estudo, não estarem protegidos contra o vetor da infecção e do agente etiológico, por isso, tornaram-se mais susceptíveis a infecção.

Opostamente, em G2, cães encoleirados apresentaram positividade superior. Bersusa et al., (2018) afirmam que a coleira com deltametrina tem um efeito demorado, pois por ser lipolítica, como os demais piretróides produzidos em laboratório, dissolve-se nos lipídeos na pele do animal, espalhando-se por todo o corpo e protegendo contra picadas dos flebótomos, assim, o atrito da coleira junto ao pescoço nos cães permite o inseticida ter contato com a pele. Porém, observou-se que mesmo os animais no estudo protegidos por coleira com deltametrina, apresentaram percentual de positividade. Eventualmente, muitas coleiras não poderiam surtir efeito protetor nos cães devido à forma de como eram manipuladas apesar de haver a troca destas a cada quatro meses e cada organismo de um cão reagir distintamente à eficácia de proteção. Outro fator importante a ser ressaltado é que o objetivo da deltametrina é eliminar o vetor ao entrar em contato com o cão, mas a coleira piretroide, em certas ocasiões, não impede alguns flebótomos de realizar repasto sanguíneo no animal o qual os tornam vulneráveis ao parasito e reagem reativos em testes sorológicos.

Respectivamente, os grupos G6 e G3 também apresentaram percentuais positivos superiores no teste, ambos os grupos pertenciam a cães imunizados e encoleirados e outros apenas imunizados. A vacina Leish-Tec aplicada nos animais com proteção de coleira em G6 impossibilitou que uma parcela desses cães ficasse imune ao parasito o que também ocorreu em G3 com o uso da vacina Leishmune®.

Pereira et al., (2020) também utilizaram os mesmos antígenos recombinantes presentes em TR-DPP® (rK28, rK39), mas elaboraram uma metodologia diferente. O trabalho analisou diferentes proteínas recombinantes quanto aos seus valores em

diagnósticos para diferenciar cães testados positivos ou negativos para LVC ou imunizados com a vacina Leish-Tec (antígeno A2). Amostras de soro foram avaliadas com ELISA composto de antígenos recombinantes específicos para avaliar a reatividade de IgG. Os resultados apresentados mostraram que os níveis de IgG aumentaram em cada anticorpo usado em cães com LVC, mesmo a reatividade sendo variável, o antígeno que mais apresentou alta sensibilidade e especificidade foi o rK28 e rK39. Amostras de cães imunizados não reagiram positivas ou acima do cut-off estabelecido em suas análises. Pereira et al., (2020) contribui com esta presente pesquisa em apresentar mais confiabilidade no teste imunocromatográfico em cães imunizados por essa vacina a qual se encontra ainda disponível no mercado.

O LESA é composto de antígenos exoantígenos ou shedados. São moléculas presentes na membrana plasmática que atuam diretamente nos processos imunológicos da célula hospedeira. Quando *Leishmanias* são cultivadas *in vitro*, esses protozoários conseguem secretar moléculas (fatores de excreção) após a fase logarítmica de seu crescimento. Essas substâncias podem desempenhar um papel espécie específico contribuindo na sorotipagem de espécies do parasito (PINEDO-CANCINO et al., 2016). De acordo com os resultados de padronização *in house*, esse ELISA é bastante sensível e específico para diagnosticar anticorpos anti-leishmania, metodologia utilizada em todas as amostras dos cães provindos de Panorama.

Este ensaio imunoenzimático não apresentou diferença significativa nos tempos. O 1º T apresentou diferença com o 2º T e também com o 3º T, segundo os resultados do teste Q de Cochran, $p^* \leq 5$. G5 além de ser o grupo que mais apresentou percentuais positivos, houve diferenciação entre os demais grupos com $p^* 0,045$. A concordância pelo índice Kappa de ELISA-LESA com TR-DPP® + ELISA com *L. major*-like foram os mesmos resultados (vice-versa) apresentados anteriormente. Entre ELISA-LESA e PCR convencional destacou-se uma concordância razoável nos grupos G3 no 2º T, G4 no 1º T, G5 e G6 no 3º T. Os demais grupos apresentaram respectivamente concordância moderada e mínima, G5 e G6 no 1º T e G4 no 3º T.

O grupo G4 apresentou o percentual de soropositividade mais elevado em todos os tempos seguido de G6 no 1º T e 2º T e G5 no 3º T. Percebe-se que houve um aumento de *n* positivos no grupo vacinado por Leish-Tec®, principalmente no 3º T e outros dos vacinados e devidamente encoleirados. Nos objetivos de Fernandes et

al., (2008), os quais analisaram se a vacina com antígeno A2 (presente em Leish-Tec®), inoculada em cães infectados pelo parasito cultivado *in vitro* o qual permitiria diferenciar cães vacinados de infectados, apresentam em seus resultados níveis aumentados dos anticorpos específicos anti IgG2 em grupos de cães imunizados e infectados por *Leishmania* (de cultura) logo após a última dose da vacinação, o que resultaria na positividade em testes sorológicos, porém, cães infectados com *Leishmania* positivaram nos testes sorológicos e os imunizados não responderam soropositividade para LVC no final de sua pesquisa, o que corrobora com o trabalho de Pereira et al., (2020). Estes resultados se distinguem deste presente estudo, pois em G4, no 2º T e 3º T dos resultados de ELISA-LESA, houve muitos cães soropositivos para LVC. Portanto, a vacina poderia desencadear reações positivas nessas amostras para LVC.

Mesmo o cão sendo imunizado, não o protege do repasto sanguíneo dos insetos vetores, pois um dos objetivos da vacina é inibir consideravelmente o crescimento da carga parasitária impedindo que o animal desenvolva a forma sintomática aguda da infecção, ainda assim, estes se perpetuam como reservatórios de *Leishmania* em áreas endêmicas, isto também foi observado em Fernandes et al., (2008) e também em Pereira et al., (2020), pois cães imunizados por Leish-Tec®, apresentaram proteção significativa, a vacina impediu o desenvolvimento de sintomas ao comparar com aqueles infectados que desenvolveram forma grave. O 3º T foi o período que mais apresentou percentuais positivos, possivelmente após o decorrer dos meses alguns cães podem ter desenvolvido resposta imunológica diferente aos demais da coorte. A variabilidade genética do parasito poderia ser também um fator que permitissem cepas de *Leishmania* tornarem-se resistentes a vacina.

Semelhante trabalho foi apresentado em Ribeiro et al., (2015), porém, os objetivos eram de analisar as habilidades dos testes de triagem para LVC a fim de diferenciar cães vacinados imunizados por Leishmune® (antígeno FML – Fucose-Manose Ligante) dos infectados. Os resultados demonstraram que a probabilidade de cães vacinados por Leishmune® avaliados como soropositivos em TR-DPP® e ELISA *L. major*-like era mínima, ou seja, não induz soropositividade nos diagnósticos, assim como em cães imunizados por Leish-Tec® de acordo com o estudo de Pereira et al., (2020). Ambos os achados reforçam nesse trabalho que o TR-DPP® mais o teste

confirmatório ELISA *L. major*-like são eficazes em apresentarem inquéritos sorológicos que distingam cães infectados de vacinados, no entanto, não há um teste padrão ouro que possa realmente comparar com esse algoritmo do Ministério da Saúde para corroborar com a confiabilidade desses inquéritos.

Um resultado interessante foram grupos que demonstraram maior positividade dos cães vacinados e encoleirados. Lopes et al., (2018), ao acompanhar essas cortes submetendo-as com as intervenções e no acompanhamento por teste sorológicos, os resultados das amostras foram positivas, diante disso, apresentaram que a melhor efetividade contra a LVC foi de cães imunizados por Leishmune® portando coleira, ou seja, as amostras sorológicas negativaram. No entanto, os resultados nesse presente trabalho apontaram que mesmo protegidos com coleira e imunizados, hipoteticamente, essas coortes positivaram pela ação da resistência às coleiras e de alguma reação cruzada, de vacinas, aplicadas nos cães no decorrer do estudo.

A técnica PCR convencional não demonstrou diferença significativa em todos os tempos analisados junto aos grupos de animais. Por meio do teste Q de Cochran, o G5 no 1º T e 2º T apresentaram distinção, $p^* \leq 5$. Este grupo se iniciou com o percentual elevado de *n* amplificados (23,08%) e no meio do estudo não houve amostras amplificadas do DNA de *Leishmania*, obteve-se no último tempo um percentual baixo de amostras positivas (7,69%).

A concordância pelo índice Kappa de PCR convencional com TR-DPP® + ELISA com *L. major*-like e ELISA-LESA foram os mesmos resultados apresentados na p. 47 e 48.

No geral, G5 foi o grupo que mais apresentou percentuais de amostras positivas em PCR convencional. No 1º T, respectivamente G5 e G2 obtiveram mais positivos. O 2º T, os grupos G3 e G6 se destacaram por mais positividade. No 3º T, o grupo G1 e novamente G5 apresentaram percentuais mais elevados que os demais grupos. A razão do grupo que se destacou com o *n* de positivos superiores aos demais, especificamente no 1º T, seria pelos cães se exporem em uma quantidade considerável ao vetor no início do estudo em comparação com outras coortes. Mesmo o animal protegido do flebótomo, ainda assim, uma pequena parcela conseguiu

realizar o repasto sanguíneo e inserir os parasitos, logo, essas amostras amplificaram conforme a análise biomolecular. O mesmo fato ocorreu no grupo G6, no entanto com o percentual inferior ao G5.

O percentual de positivos em G1 no 1º T 3º T é aceitante, pois os cães não estavam resguardados dos vetores, porém no 2º T o resultado de positivos zerou, supõe-se que o manuseio na coleta de linfonodos não aspirou células parasitadas com *Leishmania*, assim a PCR convencional não indicou presença de DNA do parasito. É importante salientar que testes como as técnicas biomoleculares e também os exames parasitológicos podem indicar o resultado negativo para LVC caso não se obter quantidade significativa parasitária. Os testes sorológicos conseguem identificar antígenos e anticorpos mesmo se a carga parasitária estiver em níveis baixos. O G2, além de apresentar a possibilidade discutida anteriormente quanto a relação coleira e a picada do flebótomo, também se complementa a questão do manuseio ao coletar essas amostras para DNA.

Gomes et al., (2007) utilizaram os mesmos primers, RV1 e RV2, empregados nas reações biomoleculares deste presente trabalho, estes, obtiveram resultados, na maioria, positivos para *L. infantum chagasi* ao comparar com o teste parasitológico, a porcentagem de concordância para resultados parasitológicos e PCR convencional foi de 92%. Em comparação desse estudo com este trabalho, observa-se que a concordância por kappa foi razoável em sua maioria, tanto entre a técnica biomolecular e o algoritmo de triagem e entre o ELISA-LESA. Semelhantemente o estudo de Almeida et al., (2013) corroboram com os achados de Gomes et al., (2007) com relação ao comportamento clínico, pois a maioria dos cães oligossintomáticos apresentaram percentual baixo enquanto que cães sintomáticos, os resultados de porcentagem foram elevados. Ambos os trabalhos contribuem com esse estudo ao que foi discutido anteriormente, mesmo que PCR convencional seja uma técnica bastante sensível, a detecção de DNA de parasito tem relação direta com a carga parasitológica em cada organismo canino. Em testes sorológicos, mesmo se quantidade parasitária for baixa, é possível ainda identificar respostas imunológicas contra antígenos ou anticorpos.

A literatura científica afirma que não é possível distinguir cães vacinados dos infectados por ELISA indireto ou pelo algoritmo de triagem do Ministério da Saúde

devido estes apresentarem reatividade cruzada com a vacina na primeira dose (DE AMORIM et al., 2010; MARCONDES et al., 2013). Em contrapartida, observa-se que tanto os achados desse estudo quanto dos demais trabalhos (RIBEIRO et al., 2015; PEREIRA et al., 2020) reforçam a eficácia do teste TR-DPP® + ELISA *L. major*-like na triagem para inquéritos caninos, assim, contribuiria mais na confiabilidade deste teste.

Não se descarta a eficácia das técnicas laboratoriais sorológicas nem de PCR convencional para investigação de LVC. Ainda são necessários mais estudos que permitam estimar se ambas as técnicas poderiam distinguir cães imunizados dos infectados. Diferenciar cães vacinados de infectados naturalmente, depende de muitos fatores como o manuseio ao coletar a amostra, carga parasitária, resposta imune individual de cada animal, resistência imunológica de certas cepas entre outros fatores.

6 - CONCLUSÃO

Os métodos sorológicos não permitiram distinguir cães infectados de imunizados com qualquer uma das duas vacinas utilizadas.

A reação em cadeia da polimerase permitiu identificar cães infectados, sendo detectado DNA de *Leishmania*, tanto em cães que sofreram alguma intervenção (coleira e vacina), como em cães que não usaram coleira ou foram imunizados.

7 - REFERÊNCIAS

A, G.; WW, Z.; G, M. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, v. 20, n. 1–2, p. 59–66, 12 out. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11567746/>>. Acesso em: 14 jul. 2021.

ALMEIDA, A. B. P. F. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 3, p. 321–324, jul. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23619344/>>. Acesso em: 6 maio. 2021.

BERSUSA. A, A, S; TOMA. S.T; ARAÚJO. C, B; MELO. C, R. H. F. de L. **Download citation of COLEIRA IMPREGNADA COM DELTAMETRINA PARA CÃES NA PREVENÇÃO DA TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL POR FLEBOTOMÍNEOS: UM PARECER TÉCNICO-CIENTIFICO**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/328783462_COLEIRA_IMPREGNADA_COM_DELTAMETRINA_PARA_CAES_NA_PREVENCAO_DA_TRANSMISSAO_DE_LEISHMANIOSE_VISCERAL_POR_FLEBOTOMINEOS_UM_PARECER_TECNICO-CIENTIFICO/citation/download>. Acesso em: 6 maio. 2021.

CB, F. et al. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine**, v. 32, n. 11, p. 1287–1295, 5 mar. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24406392/>>. Acesso em: 14 jul. 2021.

CB, P.-S. et al. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 4, p. 390–393, 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7570874/>>. Acesso em: 14 jul. 2021.

DANTAS-TORRES, F. et al. Canine leishmaniasis control in the context of one health. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 12, p. E1–E4, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31742505/>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

DAVID, J. R. et al. Deltamethrin-impregnated Dog Collars Have a Potent Anti-feeding

and Insecticidal Effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 839–847, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11562713/>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

DE AMORIM, I. F. G. et al. Humoral immunological profile and parasitological statuses of Leishmune® vaccinated and visceral leishmaniasis infected dogs from an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1–2, p. 55–63, 11 out. 2010.

DPP® Leishmaniose Canina - Bio-Manguinhos/Fiocruz. Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/produtos/reativos/testes-rapidos/dppr-leishmaniose-canina>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 2, p. 125–130, 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8780448/>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

E SILVA, R. A. et al. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 5, 1 maio 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29590235/>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA. **Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, FEP MVZ Editora, 1998-1999 v. ilustr. 23cm N.29-1999-Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia FEP MVZ Editora**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.bigstockphoto.com>. Acesso em: 6 maio. 2021.

FERNANDES, A. P. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888–5895, 29 out. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18786587/>>. Acesso em: 6 maio. 2021.

FH, Z. et al. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. **Microbes and infection**, v. 9, n. 9, p. 1070–1077, jul. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17644455/>>. Acesso

em: 14 jul. 2021.

FIGUEIREDO, F. B. et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 11, p. e180260, 1 nov. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30379198/>>. Acesso em: 6 maio. 2021.

G, G. et al. Clinical and parasitological protection in a Leishmania infantum-macaque model vaccinated with adenovirus and the recombinant A2 antigen. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 6, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24945284/>>. Acesso em: 14 jul. 2021.

G, G. et al. Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by Leishmania infantum in an endemic area with high transmission rates. **PloS one**, v. 12, n. 9, 1 set. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28953944/>>. Acesso em: 14 jul. 2021.

GA, R.; M, B. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 1, jan. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20098726/>>. Acesso em: 14 jul. 2021.

GOMES, A. H. S. et al. PCR identification of Leishmania in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 3–4, p. 234–241, 31 mar. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17196339/>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

GraphPad Software. Disponível em: <<https://www.graphpad.com/quickcalcs/>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

GRIMALDI, G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP ® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54–59, jan. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22137538/>>. Acesso em: 6 maio. 2021.

HIRAMOTO, R.M., OLIVEIRA, S.S., RANGEL, O., HENRIQUES, L.F., TANIGUCHI, H.H., BARBOSA, J.E. R., CASANOVA, C., VIVIANI JUNIOR, A., SAMPAIO, S.M.P.,

SPINOLA, R., REHDER, S., LINDOSO, J.A.L., TOLEZANO, J. E. **Classificação Epidemiológica dos Municípios do Estado de São Paulo Segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Disponível em: <<https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/10/1023237/1518211-35.pdf>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

JAIN, K.; JAIN, N. K. **Vaccines for visceral leishmaniasis: A review** *Journal of Immunological Methods* Elsevier B.V., , 11 jun. 2015. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25858230/>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

KAZIMOTO, T. A. et al. Impact of 4% deltamethrin-impregnated dog collars on the prevalence and incidence of canine visceral leishmaniasis. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 18, n. 7, p. 356–363, 1 jul. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29683394/>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

KILLICK-KENDRICK, R. et al. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, n. 2, p. 105–111, 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9226637/>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. **The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://about.jstor.org/terms>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

Leishmaniose Canina - Bio-Manguinhos/Fiocruz || Inovação em saúde || Vacinas, kits para diagnósticos e biofármacos. Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/produtos/reativos/ensaios-sorologicos/imunoenzimatico/leishmaniose-canina>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

Leishmaniose Visceral — Português (Brasil). Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/l/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

LOPES, E. G. et al. Vaccine effectiveness and use of collar impregnated with insecticide for reducing incidence of Leishmania infection in dogs in an endemic region for visceral leishmaniasis, in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 146, n. 3, p. 401–406, 1 fev. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29345601/>>.

Acesso em: 5 maio. 2021.

MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE, V. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Brasília-DF 2014 MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica 1ª edição 5ª reimpressão.** [s.l.: s.n.]

MARCONDES, M. et al. 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®. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 649–652, 8 out. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23920056/>>. Acesso em: 6 maio. 2021.

MedCalc statistical software - free trial available. Disponível em: <<https://www.medcalc.org/>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

Nota Técnica Conjunta nº 1. Disponível em: <http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/nota-tecnica-no.-1-2011_cglab_cgdt1_lvc.pdf>. Acesso em: 5 maio. 2021.

OLIVEIRA, T. M. F. S. et al. IgG subclass profile of serum antibodies to Leishmania chagasi in naturally infected and vaccinated dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1–2, p. 16–22, 26 maio 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19345019/>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

PAIVA DE CAMPOS, M. et al. Can vaccines against canine visceral leishmaniasis interfere with the serological diagnostics recommended by the Brazilian Ministry of Health? Vacinas anti-leishmaniose visceral canina podem interferir no diagnóstico sorológico preconizado pelo Ministério da Saúde brasileiro? 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160846>>. Acesso em: 6 maio. 2021.

PATTABHI, S. et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, set. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20856856/>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

PEREIRA, I. E. et al. Performance of recombinant proteins in diagnosis and differentiation of canine visceral leishmaniasis infected and vaccinated dogs.

European Journal of Microbiology and Immunology, v. 10, n. 3, p. 165–171, 29 ago. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32857712/>>. Acesso em: 6 maio. 2021.

PESSOA-E-SILVA, R. et al. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. **Experimental Parasitology**, v. 199, p. 9–16, 1 abr. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30796913/>>. Acesso em: 6 maio. 2021.

PINEDO-CANCINO, V. et al. Evaluation of Leishmania (Leishmania) infantum excreted-secreted antigens for detection of canine leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 161, p. 41–43, 1 set. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27212707/>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

RIBEIRO, R. A. N. et al. Ability of immunodiagnostic tests to differentiate between dogs naturally infected with Leishmania infantum and Leishmune®-vaccinated dogs. **Veterinary Research Communications**, v. 39, n. 2, p. 87–95, 13 jun. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25874857/>>. Acesso em: 6 maio. 2021.

TESH, R. B. **Control of zoonotic visceral leishmaniasis: Is it time to change strategies?** **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** American Society of Tropical Medicine and Hygiene, , 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7694973/>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

TESTASICCA, M. C. d. S. et al. Antibody responses induced by Leish-Tec®, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. **Veterinary parasitology**, v. 204, n. 3–4, p. 169–176, 29 ago. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24863572/>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

WHO | **Epidemiological situation.** Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

8 - ANEXOS

8.1 - CERTIFICADO CEUA

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **"UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS SOROLÓGICAS E MOLECULARES NA DISTINÇÃO DE CÃES VACINADOS E NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (L.) infantum chagasi*"**, registrada com o nº 1429/2019, sob a responsabilidade de José Ângelo Lauletta Lindoso e Joedh dos Santos, apresentada pelo Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 11.12.19

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 21-05-2018 Término: 21-05-2021
Espécie/linhagem/raça	Cães
Nº de animais	Amostras de soros e DNA de linfonodos
Peso/Idade	Não se aplica
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	cães de uma área autóctone de leishmaniose

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 11 de dezembro de 2019

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

8.2 - RESULTADOS TABELADOS

		TESTES SOROLÓGICOS									TESTE MOLECULAR PCR		
		TR-DPP®			ELISA L. major like			ELISA LESA			PCR CONVENCIONAL, ALVO KDNA		
Amostras Nº	GRUPO	1º tempo	2º tempo	3º tempo	1º tempo	2º tempo	3º tempo	1º tempo	2º tempo	3º tempo	1º tempo	2º tempo	3º tempo
4432	G6	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12909	G5	NR	NR	R	NR	R	R	NR	NR	R	NA	NA	NA
7530	G6	NR	NR	R	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12862	G1	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12868	G6	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12872	G1	NR	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
10758	G2	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	A	NA	A
12919	G1	NR	NR	R	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	A
12912	G3	NR	NR	NR	R	R	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12732	G5	NR	NR	NR	R	R	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12843	G2	R	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12892	G3	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NA	A	NA
12861	G5	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12672	G6	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R	A	NA	NA
12869	G5	NR	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12873	G5	NR	R	R	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
9065	G4	NR	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12813	G2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12958	G5	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12339	G3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
10772	G2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12691	G5	NR	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12646	G6	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12886	G5	NR	R	R	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12212	G5	NR	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12805	G2	NR	NR	NR	R	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12814	G3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
7687	G2	NR	R	R	NR	R	R	NR	NR	R	NA	NA	NA
13036	G3	NR	NR	R	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
4472	G2	NR	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12829	G1	R	NR	R	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12214	G6	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12871	G6	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12818	G2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12828	G5	NR	R	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12803	G4	NR	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12891	G4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12710	G2	NR	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
9100	G6	NR	NR	R	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12782	G4	NR	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12713	G2	NR	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12940	G2	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12821	G1	NR	NR	NR	R	R	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12959	G2	R	R	NR	R	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
10521	G5	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
3652	G2	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
10647	G3	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12817	G3	NR	R	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12888	G6	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12772	G2	NR	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12887	G4	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12714	G3	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	R	NA	NA	NA
12808	G6	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
9101	G5	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
10771	G4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12218	G6	NR	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	R	NA	NA	A
9846	G5	R	NR	R	NR	NR	R	NR	NR	NR	A	NA	NA
11755	G4	NR	R	R	NR	NR	R	NR	R	R	NA	NA	NA
12241	G4	R	R	R	NR	NR	NR	NR	R	R	NA	NA	NA
12663	G5	R	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA

13062	G4	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
7845	G2	R	R	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NR	A	NA	NA
12243	G1	NR	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12242	G6	R	R	NR	NR	NR	R	NR	R	NR	NR	NA	NA	NA
12223	G1	NR	R	R	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	A	NA	NA
2717	G3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12226	G6	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
11667	G2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12220	G4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12225	G4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	NA	NA	NA
11662	G1	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12248	G3	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	R	NR	NA	NA	NA
8006	G5	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	R	NR	A	NA	NA
1735	G4	R	NR	R	R	R	NR	R	R	NR	NR	NA	NA	NA
9608	G6	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12224	G3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12244	G2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
9825	G5	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	R	NR	NR	A	NA	NA
12249	G6	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	R	R	NR	NA	NA	NA
12236	G6	NR	NR	R	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12254	G6	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	R	R	NR	NA	NA	NA
12221	G5	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	R	R	NR	NA	NA	NA
11248	G2	NR	R	R	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12209	G2	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
9942	G1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12215	G4	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
8848	G5	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13061	G1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13054	G5	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12955	G1	R	R	NR	ZC	R	R	NR	R	R	NR	NA	NA	NA
7689	G4	R	R	R	NR	R	R	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12990	G2	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
5711	G3	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13003	G6	NR	NR	R	R	R	R	R	R	R	R	A	NA	NA
12989	G4	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13063	G3	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13040	G2	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NR	A	NA	A
12330	G5	NR	R	R	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12963	G6	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13059	G1	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	A	NA	NA
12904	G2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13032	G5	R	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	R	NR	NA	NA	A
11800	G2	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12906	G4	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13015	G3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13051	G3	NR	R	NR	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
9162	G2	R	NR	NR	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	NA	NA	NA
13052	G1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12983	G6	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	NA	NA	NA
13012	G5	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12981	G5	R	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13048	G3	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	R	NR	NR	NA	NA	NA
9164	G2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12908	G4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13009	G2	NR	NR	NR	R	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13008	G4	NR	NR	NR	R	R	R	R	R	R	R	NA	NA	NA
10843	G5	NR	R	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13011	G3	R	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12905	G6	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13060	G5	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
4274	G4	R	NR	NR	NR	NR	NR	R	NR	R	NR	NA	NA	NA
12966	G3	NR	NR	NR	R	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12991	G6	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
9137	G6	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NA	NA	NA
12962	G3	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13053	G4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12210	G3	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12950	G5	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	R	R	NR	NA	NA	NA
12333	G6	NR	NR	R	NR	R	NR	NR	R	NR	NR	NA	NA	NA
12761	G6	R	R	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12759	G5	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA

12822	G4	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	R	NA	NA	NA
10466	G4	R	R	R	NR	R	R	NR	NR	R	NA	A	NA
11688	G3	NR	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	A	NA	NA
10746	G1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12560	G5	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	A	NA	NA
12807	G1	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12882	G2	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13026	G3	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13028	G3	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
9023	G5	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	A
12577	G5	R	NR	NR	NR	R	R	NR	R	R	A	NA	NA
12716	G4	R	R	R	NR	NR	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12640	G1	R	R	R	NR	R	R	NR	R	R	NA	NA	NA
12889	G2	R	R	R	NR	NR	NR	NR	R	R	NA	NA	NA
10727	G3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12779	G6	NR	NR	R	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12776	G6	R	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13019	G4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R	R	NA	NA	NA
10625	G4	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	R	NR	NA	NA	NA
12564	G1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12797	G1	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12624	G5	R	R	NR	NR	R	R	NR	R	R	A	NA	A
12839	G3	NR	R	R	NR	NR	R	NR	NR	R	A	NA	NA
12857	G1	NR	R	R	NR	R	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13018	G6	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	A	A
12562	G3	NR	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12855	G4	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
10671	G4	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12837	G4	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
10035	G1	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12800	G6	NR	R	R	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12794	G3	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12736	G4	NR	NR	NR	R	NR	NR	R	R	NR	NA	NA	NA
13031	G3	R	NR	NR	R	R	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12845	G3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12575	G1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12685	G3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12694	G4	NR	R	NR	R	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
10706	G5	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12832	G1	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12655	G4	NR	R	R	NR	R	R	NR	NR	R	NA	NA	A
12798	G5	R	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12773	G1	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
10656	G1	NR	NR	NR	R	R	R	NR	NR	NR	NA	NA	NA
13013	G1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
7417	G4	NR	NR	NR	R	R	R	R	NR	NR	A	NA	NA
12836	G5	NR	R	R	R	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12852	G3	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
9107	G1	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12820	G5	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12960	G4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
9868	G6	NR	NR	NR	R	R	NR	R	NR	NR	NA	NA	NA
12416	G3	NR	NR	R	NR	R	R	NR	R	R	NA	A	NA
12282	G3	NR	R	R	NR	R	NR	NR	R	NR	NA	NA	NA
9866	G3	NR	NR	R	R	NR	NR	R	NR	NR	NA	NA	NA
1259	G5	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	A	NA	NA
9888	G4	NR	R	R	NR	NR	NR	NR	R	NR	NA	NA	NA
10037	G2	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12384	G1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12443	G3	NR	R	R	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12274	G4	NR	R	R	NR	NR	R	NR	NR	R	NA	NA	NA
9869	G1	NR	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	A
12424	G5	NR	R	NR	NR	R	NR	NR	R	NR	A	NA	NA
8063	G4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R	NR	R	NA	NA	NA
12341	G2	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12258	G3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	A	NA	NA
12265	G5	NR	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
12280	G3	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NA	NA	NA
9892	G5	NR	R	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	A	NA	NA

(Continuação 8.2 - resultados tabelados) Lê-se: G1: Cães que não utilizaram as coleiras inseticidas e não foram vacinados; G2: Cães que utilizaram a coleira impregnada com deltametrina, trocadas a cada quatro meses; G3: Cães imunizados pela vacina Leishmune® (2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); G4: Cães imunizados pela vacina Leish-tech® (2ª e 3ª dose com intervalo de 21 dias); (continuação figura 13) G5: Cães imunizados pela vacina Leishmune®, portando coleira; G6: Cães imunizados pela vacina Leish-tech®, portando coleira.

R: Reagente

NR: Não-reagente

ZC: Zona Cinza

A: Amplificado

NA: Não-amplificado