

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

GABRIELA DÖWICH PRADELLA

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO ELISA “IN HOUSE” PARA
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE EM EQUINOS E CANINOS**

Uruguaiana

2021

GABRIELA DÖWICH PRADELLA

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO ELISA “IN HOUSE” PARA
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE EM EQUINOS E CANINOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Roberto Thiesen

Coorientadora: Claudia Acosta Duarte

**Uruguaiiana
2021**

D112p Döwich Pradella, Gabriela
PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO ELISA "IN HOUSE" PARA
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE EM EQUINOS E CANINOS /
Gabriela Döwich Pradella.
57 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2021.
"Orientação: Roberto Thiesen".

1. Leishmania spp.. 2. Sorologia. 3. Cães. 4.
Equinos. I. Título.

GABRIELA DÖWICH PRADELLA

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO ELISA “IN HOUSE” PARA
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE EM EQUINOS E CANINOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Sanidade Animal

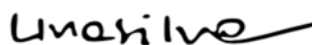
Tese defendida e aprovada em: 22 de fevereiro de 2021
Banca examinadora:



Profª Dr. Claudia Acosta Duarte
Coorientadora
Universidade Federal do Pampa- UNIPAMPA



Profº Dr. Michel Mansur Machado
Universidade Federal do Pampa- UNIPAMPA



Profª Dr. Lívia Kmetzsch Rosa e Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS

Dedico este trabalho a minha mãe, meu esposo,
minhas orientadoras e minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a UNIPAMPA pela oportunidade de realizar todo o aprimoramento profissional. As agências de fomento que realizam um auxílio indispensável para que sejamos capazes de nos dedicar aos estudos e pesquisas.

Agradeço as minhas coorientadoras Cláudia e Irina que estão sempre dispostas a ajudar e vêm guiando meus passos durante esta jornada desde a época da graduação. Que mesmo nos momentos de dificuldade conseguem dar a volta por cima e seguir com as pesquisas e estudos.

Ao meu orientador Roberto pela oportunidade para a realização do mestrado e por estar sempre solícito quando precisei. Ao professor Mário por todos os ensinamentos e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

A toda a equipe do laboratório de Microbiologia veterinária da UNIPAMPA por me receber mais uma vez de forma acolhedora. Local onde, além do trabalho, existe muita amizade e companheirismo.

A Luísa pelo suporte incansável e auxílio na preparação do material e realização dos testes além da amizade e apoio em todos os momentos.

A Taiane com quem iniciei neste projeto e, desde então, serve de inspiração para que siga determinada e busque dar o melhor de mim em todos os momentos.

Ao meu esposo por estar sempre ao meu lado e me dar suporte para a realização da pós-graduação. A minha mãe que nunca mediu esforços para possibilitar nossa formação e continua me apoiando em todas as etapas da minha formação.

Agradeço a minha família pelo carinho e compreensão nos momentos de ausência. Aos amigos que acompanharam esta jornada e a tornaram mais leve.

A todos o meu muito obrigada.

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado
é alguém que acredite que ele possa ser
realizado.”

Roberto Shinyashiki

RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas pelo protozoário *Leishmania spp.* e estão distribuídas globalmente. Na América do Sul, o Brasil concentra o maior número de casos de leishmaniose visceral e cutânea em humanos. No estado do Rio Grande do Sul, na região da fronteira Oeste, é descrita a presença do flebotomíneo vetor e, também, a infecção em humanos, caninos e equinos. O cão doméstico é o principal reservatório nas zonas urbanas, entretanto, a participação dos equinos na manutenção do parasito vem sendo discutida. Diferentes técnicas diagnósticas estão disponíveis para identificação tanto do agente quanto da resposta imunológica do indivíduo. O teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) permite a identificação da resposta imune por meio da ligação antígeno anticorpo. Em 2011, foi definido como teste confirmatório para Leishmaniose visceral canina (LVC) pelo Ministério da Saúde. Tendo em vista a importância da Leishmaniose em cães no município de Uruguaiana e, a necessidade de estudos referentes à manutenção da doença e possíveis reservatórios, o presente trabalho teve por objetivo a padronização de um protocolo “*in house*” de ELISA indireto para detecção de resposta imunológica contra *Leishmania spp.* nas espécies canina e equina, bem como a avaliação sorológica de amostras provenientes dos municípios de Uruguaiana e Barra do Quaraí-RS. Inicialmente, foram padronizados os protocolos para o cultivo de *Leishmania* no laboratório. As cepas de *Leishmania infantum*, espécie utilizada como antígeno, foram disponibilizadas pela FRIOCRUZ/RJ. A fixação do antígeno foi realizada utilizando as formas promastigotas do parasito, sendo que, a concentração de 10ug/ml demonstrou melhores resultados. O protocolo de ELISA utilizado para as espécies equina e canina foram iguais. O teste das diluições do anticorpo primário variou entre as espécies: para equinos foram utilizadas as concentrações 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 e 1/1000; e para caninos 1/100, 1/400 e 1/800. As concentrações de anticorpo secundário utilizadas nos testes foram de: 1/5000 e 1/10000 para equinos e caninos. Após a padronização, foram realizados os testes sorológicos em amostras provenientes de caninos e equinos dos municípios de Barra do Quaraí e Uruguaiana. Foram testados 51 cães e 159 equinos. Dentre os 51 caninos testados, 17 (33%) foram positivos na técnica de ELISA sendo que, 16 destes foram também positivos no teste imunocromatográfico DPP®. Referente aos equinos testados, 159 animais, 16 (10%) foram positivos no ELISA. Com isso, pode-se concluir que, foi possível a padronização de um protocolo de ELISA indireto “*in house*” para diagnóstico da leishmaniose em equinos e caninos e, a presença de animais positivos demonstra que há circulação da doença na população estudada.

Palavras-chave: *Leishmania spp.*; cães; cavalo; sorologia; teste imunoenzimático.

ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases caused by the protozoan *Leishmania spp.* and are distributed globally. In South America, Brazil concentrates the most significant number of visceral and cutaneous leishmaniasis cases in humans. In the western border of the state of Rio Grande do Sul, Brazil, there are reports about sandflies (the vectors) and the infection in humans, canines, and horses. The domestic dog is the main reservoir in urban areas; however, there is a discussion about horses' participation in the maintenance of the parasite. Several diagnostic techniques are available to identify both the agent and the individual's immune response. The ELISA test (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) allows identifying the immune response through antibody-antigen binding. In 2011, it was defined as a confirmatory test for canine visceral Leishmaniasis (LVC) by the Ministry of Health. Given the importance of Leishmaniasis in dogs in the municipality of Uruguaiana and the need for studies regarding the maintenance of the disease and possible reservoirs, the present work aimed to standardize an in house indirect ELISA protocol to detect an immune response against *Leishmania spp.* in canine and equine species, as well as the serological evaluation of samples from the municipalities of Uruguaiana and Barra do Quaraí-RS. Initially, protocols for the cultivation of *Leishmania* in the laboratory were standardized. The strains of *Leishmania infantum*, a species used as an antigen, were made available by FRIOCRUZ / RJ. Antigen fixation was performed using the parasite's promastigote forms, and the concentration of 10ug/ml demonstrated the best results. The ELISA protocol used for equine and canine species was the same. The test of the dilutions of the primary antibody varied between species: for horses, the concentrations 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, and 1/1000 were used; and 1/100, 1/400, and 1/800 for canines. The secondary antibody concentrations used in the tests were: 1/5000 and 1/10000 for horses and canines. After standardization, serological tests were carried out on samples from canines and horses from the municipalities of Barra do Quaraí and Uruguaiana. Testes englobed 51 dogs and 159 horses. Among the 51 canines tested, 17 (33%) were positive in the ELISA technique, 16 of which were also positive in the DPP® immunochromatographic test. Regarding the tested horses, 159 animals, 16 (10%) were positive in the ELISA. With this, it was possible to conclude that it was possible to standardize an indirect ELISA protocol in house to diagnose Leishmaniasis in horses and canines. The presence of positive animals demonstrates that the disease is occurring in the studied population.

Keywords: *Leishmania spp.*; dogs; horse; serology; immunoassay test

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Classificação taxonômica da *Leishmania*, espécies do velho e novo mundo.....17
- FIGURA 2:** Arquitetura celular básica da *Leishmania*. A) *Leishmania brasiliensis* em um corte longitudinal, aumento de 20.000x, com destaque para a membrana plasmática (PM). B) *Leishmania brasiliensis* em maior aumento (50000x) com destaque para a secção transversal do flagelo (F). A e B é possível observar: núcleo (N), mitocôndria (M), complexo de Golgi (G), retículo endoplasmático (E), vacúolo (V), flagelo (F), cinetoplasto (K), membrana plasmática (PM) e reservatório (R).....18
- FIGURA 3:** Ciclo biológico da Leishmaniose.....22
- FIGURA 4:** Exemplar adulto (fêmea) de *Lutzomyia longipalpis* (Psychodidae: Phlebotominae) exercendo hematofagia.....23
- FIGURA 5:** Leishmaniose em um cão. Animal apresentando lesão periocular causada por infecção ativa de *Leishmania infantum*.....25
- FIGURA 6:** A) Equino apresentando a forma cutânea da Leishmaniose com múltiplos nódulos na derme, região ventral ao olho direito (seta). B) Granuloma inflamatório subdermal (círculo) com presença de macrófagos. C) Micrografia eletrônica da pele evidenciando a presença de formas amastigotas de *Leishmania sp.* em macrófagos.....26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Histórico.....	15
2.2 Agente infeccioso.....	16
2.3 Epidemiologia humana e animal.....	18
2.4 Ciclo Biológico.....	22
2.5 O vetor.....	23
2.6 Apresentação clínica em caninos e equinos.....	24
2.7 Diagnóstico.....	26
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivos gerais.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4 CAPÍTULO 1- Manuscrito.....	31
5 DISCUSSÃO GERAL.....	45
6 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO A- Protocolo de aprovação da pesquisa pelo comitê de ética em uso animal.....	56

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION [PAHO], 2018). Estão presentes em áreas focais de mais de 90 países nos trópicos, subtropicais e no sul da Europa, em todos os continentes, exceto na Austrália e na Antártida (BENASSI et al., 2018; BRAVO et al., 2013; CDC, 2020; GRILL & ZURMENDI, 2017).

O gênero *Leishmania* faz parte da família Tripanosomatidae e apresenta características digenética, necessitando dois hospedeiros para completar seu ciclo. As formas promastigotas são encontradas no trato digestório do flebotômio e, quando ocorre o repasto sanguíneo, são transformadas em formas amastigotas nas células dos hospedeiros vertebrados (PETERS & KILLICK-KENDRICK, 1987).

No Brasil, as principais espécies de flebotômios envolvidas na transmissão da leishmaniose visceral são a *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (DOS SANTOS et al., 1998), vetores que se adaptam facilmente a mudanças de temperatura e possuem atividade crepuscular e noturna (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2006).

O cão doméstico (*Canis familiaris*) é o principal reservatório de diversas espécies de *Leishmania*, desempenhando um papel importante na manutenção do protozoário. Possui participação zoonótica já bem definida na transmissão de *L. (L.) infantum*. As diferentes espécies do gênero *Leishmania* causam doenças chamadas leishmanioses, que variam de acordo com padrões epidemiológicos e clínicos desde casos assintomáticos, lesões na pele até casos graves de comprometimento visceral e morte (DANTAS-TORRES, 2007).

Os primeiros casos de leishmaniose visceral canina (LVC) relatados no estado do Rio Grande do Sul ocorreram em Santa Maria e Cruz Alta (KRAUSPENHAR et al., 2007; POCAI et al., 1998). Na região de fronteira Brasil-Argentina, o primeiro caso foi registrado no município de São Borja, em 2008 (SOUZA et al., 2009). Em 2009, a Secretaria Estadual da Saúde - SES/RS notificou o primeiro caso autóctone confirmado de leishmaniose visceral humana (LVH) na cidade. O município de Uruguaiana confirmou o primeiro caso humano em 2011, seguido de Itaqui em 2012 (CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE [CEVS], 2017).

Tem se elucidado a participação da espécie equina no ciclo da doença. No município de Uruguaiana/RS, nas zonas urbana e rural, foram detectados equinos positivos para *Leishmania spp.* utilizando técnicas moleculares (ESCOBAR et al., 2019; PRADELLA et al., 2020). Corroborando com estes achados, Evers et al. (2017), demonstraram elevada soroprevalência de *Leishmania spp.* em equinos enviados a dois matadouros registrados no Serviço de Inspeção Federal que recebeu animais provenientes de 6 estados brasileiros (Paraná, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás). É necessária a realização de uma investigação mais aprofundada para determinação da real importância dos equinos no ciclo da doença.

Dentre as técnicas diagnósticas, podem ser citados os métodos: parasitológico (DE SOUSA et al., 2017; SARIDOMICHELAKIS et al., 2005), sorológico (AISA et al., 1998; FIGUEIREDO et al., 2018) e molecular (ESCOBAR et al., 2020; ESCOBAR et al., 2019). A técnica de ELISA, tem sido amplamente utilizada e possui uma ótima aplicação prática para detecção de resposta imunológica contra *Leishmania spp.* (HOMMEL et al., 1978). Pode ser realizada com proteínas purificadas, o que reduz significativamente o número de falsos positivos, ou então, pode ser utilizado cultivo de *Leishmania* para preparação do antígeno (RAJASEKARIAH et al., 2001).

As leishmanioses causam agravo à saúde pública e estão entre as doenças tropicais negligenciadas. A realização do diagnóstico precoce e abordagem com medidas preventivas são de extrema importância para o combate da doença. Tendo em vista os fatores abordados, o presente trabalho teve por objetivo a padronização de um protocolo “*in house*” de ELISA indireto para detecção de resposta imunológica contra *Leishmania spp.* nas espécies canina e equina, assim como, a aplicação prática do teste em amostras provenientes dos municípios de Uruguaiana e Barra do Quaraí/RS.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

Em 1827, o médico William Twining, que estava trabalhando para o exército Indiano em Bengala, descreveu o kala-azar como uma doença crônica causadora de esplenomegalia e que afetava tanto os europeus quanto as comunidades indígenas. Observou que os sinais clínicos relacionados incluíam: emagrecimento, anemia aguda e febre intermitente. Recomendava quinina e ferro para o tratamento da doença do baço (COOK, 2001).

Ronald Ross, em 1898, foi nomeado para trabalhar nas pesquisas relacionadas à transmissão do kala-azar. No exame patológico, ele verificou pequenas evidências de parasitos presentes no sangue e recomendou que os médicos oficiais fossem treinados para, além de reconhecer os sinais clínicos, identificar os microrganismos no sangue utilizando microscópio. Outra observação importante foi de que, a quinina não era eficaz no tratamento da doença, ao contrário do que era evidenciado no tratamento de casos de malária (VINCENT, 2017).

Assim, Ronald Ross se tornou uma influência para os trabalhos de William Boog Leishman, um jovem treinado na escola médica do exército e que foi enviado para a Índia em 1890 levando consigo um microscópio. O jovem relatou que muitos homens apresentavam úlceras na pele conhecidas como “*Delhi boils*”, úlceras tropicais. Leishman também observou que muitos soldados foram enviados para casa com sintomatologia febril, anemia, atrofia muscular e esplenomegalia. Estes fatos auxiliaram no entendimento de que se tratava de uma doença nova na época, que foi nomeada “*Dum Dum fever*” (VINCENT, 2017).

Em 1900, Leishman avaliou um paciente com os sintomas por ele já descritos, realizando coleta de sangue e necropsia. Foram encontrados, na avaliação microscópica de esfregaço do baço, diversos corpos pequenos que apresentavam uma característica distinta das células sanguíneas com um padrão duplo de cromatina. Porém, apenas em 1903, ele identificou em ratos que morreram de tripanossoma, organismos semelhantes e pode sugerir que a doença observada por ele em 1900 era causada por uma espécie de tripanossoma (LEISHMAN, 1903). Mais tarde, neste mesmo ano, Charlen Donovan relatou que já havia observado as mesmas estruturas relatadas por Leishman e esta informação foi comprovada por Ronald Ross, concluindo que Leishman havia descoberto um novo microrganismo (ROSS, 1903).

Levando em consideração todos estes achados e outros trabalhos que estavam sendo publicados em diferentes partes do mundo (Índia, China, Tunísia, Argélia, Arábia e Egito), a seção de doenças tropicais da associação médica britânica (BMA- British Medical Association) lançou, em 1904, um simpósio chamado: “Discussão sobre o corpo de Leishman-Donovan”. Neste encontro, Leishman observou que cientistas franceses, Laveran e Mesnil, encontraram parasitas semelhantes em casos de “*Delhi boils*”. Foi então que, em 1907, após estudos e discussões, os pesquisadores sugeriram que o kala-azar, doença visceral, e a “*Delhi boils*” ou feridas tropicais, eram causadas por diferentes espécies do mesmo gênero, a *Leishmania* (VINCENT, 2017).

Em uma revisão completa publicada por Leishman em 1911, fica clara a distinção entre uma forma sistêmica e uma forma cutânea das chamadas leishmanioses. Para facilitar o entendimento, Leishman utilizou 3 classificações para as doenças: kala-azar Indiano (*L. Donovanii*, Laveran), kala-azar infantil (*L. infantum*, Nicolle), e ferida tropical (*L. tropica*, Wright). A infecção experimental em animais, buscando identificar a epidemiologia da doença, foi realizada com sucesso por Nicolle, utilizando cepas de *L. infantum* em cães e macacos. Entretanto, pesquisadores franceses não conseguiram infectar cães e macacos com cepas de *L. donovani*. A partir destes experimentos foi sugerida a transmissão entre cães e, de cães para os seres humanos, além da possibilidade do envolvimento de animais silvestres no ciclo da doença (LEISHMAN, 1911).

Após este período, alguns outros autores relataram a presença de “corpos azuis” em esfregaços, relacionando os casos clínicos com os achados na microscopia, nomeando-os corpos Leishman-donovan (CHRISTOPHERSON, 1922).

2.2 Agente infeccioso

A leishmaniose é causada por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* (CDC, 2020). É relatado que existem no mínimo 20 espécies capazes de causar doença em humanos (BURZA et al., 2018). Após muitos anos de estudos e discussão, com relação a classificação das espécies, em 1987, uma nova classificação foi adotada levando em consideração dados moleculares. As espécies foram divididas em duas linhagens filogenéticas:

Euleishmania (incluindo as subespécies *Leishmania* e *Viannia*) e Paraleishmania (PETERS & KILLICK-KENDRICK, 1987). Na subespécie *Leishmania*, dentro do complexo donovani, estão classificadas as seguintes espécies: *L. (L) donovani* (ROSS, 1903); *L. (L) infantum* (NICOLE, 1908) e *L. (L) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937; PETERS & KILLICK-KENDRICK, 1987), espécies de importância clínica para a saúde humana e animal. As demais espécies pertencentes ao novo e velho mundo estão ilustradas na FIGURA 1.

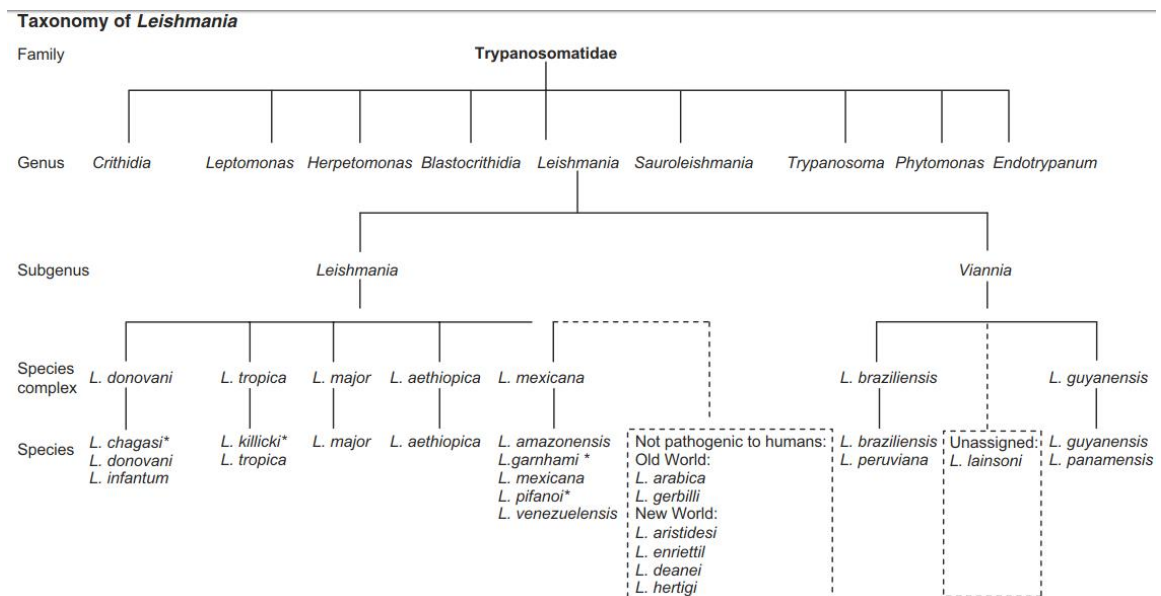


FIGURA 1- Classificação taxonômica da *Leishmania*, espécies do velho e novo mundo. Fonte: World Health Organization [WHO], 2010.

O gênero *Leishmania* faz parte do reino protista (protozoa), família Trypanosomatidae e, apresenta características digenética, sendo necessário dois hospedeiros para que seja completado o seu ciclo. As formas promastigotas, com presença de flagelos, são encontradas no trato digestório do flebotômíneo e, quando ocorre o repasto sanguíneo, são transformadas em amastigotas, livres de flagelos, nas células do sistema reticuloendotelial (monócitos e macrófagos) dos hospedeiros vertebrados (PETERS & KILLICK-KENDRICK, 1987).

A arquitetura celular básica das *Leishmanias* (FIGURA 2) é mantida em suas duas formas (promastigota e amastigota), sendo formada basicamente por um microtúbulo contendo o núcleo, com formato redondo, e as organelas necessárias para o seu desenvolvimento, tais como mitocôndrias e complexo de Golgi. O material genético está contido no cinetoplasto, material extranuclear, onde se encontra o DNA mitocondrial (kDNA) do organismo (ALEMAN, 1969).

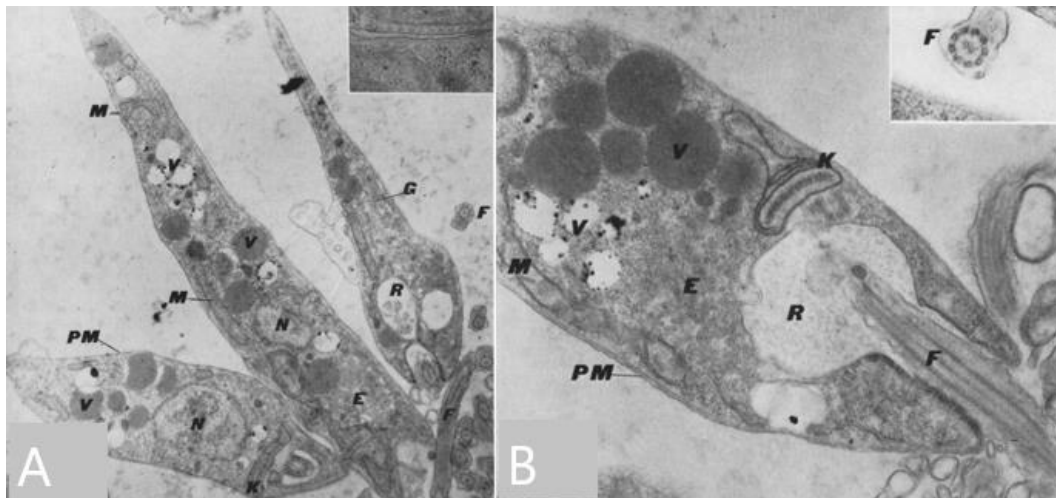


FIGURA 2: Arquitetura celular básica da *Leishmania*. A) *Leishmania brasiliensis* em um corte longitudinal, aumento de 20.000x, com destaque para a membrana plasmática (PM). B) *Leishmania brasiliensis* em maior aumento (50000x) com destaque para a secção transversal do flagelo (F). A e B é possível observar: núcleo (N), mitocôndria (M), complexo de golgi (G), retículo endoplasmático (E), vacúolo (V), flagelo (F), cinetoplasto (K), membrana plasmática (PM) e reservatório (R). Fonte: ALEMAN, 1969.

2.3 Epidemiologia humana e animal

As leishmanioses estão entre as 10 doenças tropicais negligenciadas globalmente, contando com mais de 12 milhões de pessoas infectadas, 20 a 30 mil mortes e de 0,9 a 1,6 milhões de novos casos por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO], 2018). Em 2018, 92 países foram considerados endêmicos, ou tiveram casos reportados, de leishmaniose cutânea (LC) e, 83 países de leishmaniose visceral (LV). A Organização mundial de saúde (WHO) alerta que, atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas habitam áreas endêmicas para as leishmanioses, correndo o risco de infecção. Anualmente, estima-se que ocorram 30.000 novos casos de LV e mais de 1 milhão de LC (WHO, 2018).

A maioria dos novos casos humanos reportados, 20.792 (94%), pela organização mundial de saúde no ano de 2017, ocorreram em sete países, sendo eles: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Um grande entrave no tratamento é a coinfeção com HIV, este fato é observado em 35 países e dificulta o manejo clínico destes pacientes (WHO, 2018). Em 2017, 7,97% (338) dos casos apresentaram coinfeção LV/HIV nas Américas, sendo

que, 322 (95,3%) ocorreram no Brasil, 13 (3,85%) casos no Paraguai, 2 (0,59%) na Argentina e 1 (0,3%) na Colômbia (ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE [OPAS]; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [OMS], 2019).

Nas Américas, cerca de 55 mil casos de LC e muco cutânea (LM) são registradas anualmente. Os casos de leishmaniose visceral apresentam-se em menor número, 3.500 por ano. A LV está presente em 13 países da América, dentre eles: Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Paraguai, Uruguai e Venezuela. Os casos de LC ocorrem do Sul dos Estados Unidos ao Norte da Argentina, com casos registrados em 20 países e, destes, 18 são endêmicos: Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, Guiana Francesa, Guiana, Honduras, Nicarágua, México, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname e Venezuela. Dentre os 10 países com maior número de LC, quatro estão nas Américas: Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION [PAHO], 2018).

Para monitorar e controlar a ocorrência das leishmanioses, em humanos, nas Américas, foi criado um sistema regional de informações denominado SisLeish. Um programa online, desenvolvido em 2012, com o intuito de ser uma ferramenta simples e de fácil acesso, preenchida anualmente pelos responsáveis, onde cada país pode optar pela adesão. No ano de 2015, todos os países endêmicos na América aderiram ao programa, sendo eles: Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela. Anualmente, é gerado um relatório epidemiológico com os dados referentes ao SisLeish e, estes são disponibilizados para o público em geral na página da PAHO/WHO (MAIA-ELKHOURY et al., 2017).

Em 2017, 49.959 casos de LC e LM foram registrados no programa SisLeish por 17 países endêmicos. Em relação ao ano de 2016, houve uma diminuição do número de casos em 9 países, entretanto, devido ao aumento de casos em alguns deles (Brasil [38%], Costa Rica [94%], México [88%] e Equador [36%]), o número total na região manteve-se estável. Destes, 99,9% (49.354) dos casos registraram a variável sexo, sendo a maior ocorrência em pacientes do sexo masculino (68,7% - 34.305 casos) (OPAS; OMS, 2019). As informações se mantiveram no ano de 2018 (70% sexo masculino - 32.049 casos) (PAHO; WHO, 2019).

Dentre os 17 países que reportaram casos de LC, doze (70%) apresentaram mais de 10% dos relatos no ano de 2017, em menores de 10 anos (14,35%- 7.168 casos). Este dado é de extrema importância visto que, até 2022, uma das metas regionais do Plano de Ação de leishmanioses é reduzir a prevalência nesta parcela da população em 50% (OPAS; OMS, 2019). No ano de 2018, já foi possível visualizar uma diminuição nos casos referentes a esta faixa etária para 12,7% (5.846 casos) (PAHO; WHO, 2019).

Em 2018, do total de casos de LC/LM registrados pelo programa, 84% ocorreram no Brasil (16.432), Colômbia (6.362), Peru (6.321), Nicarágua (3.722), Bolívia (3.127) e Venezuela (2.612). Houve um aumento de 10,5% dos casos em departamentos, estados, regiões e/ou províncias (dependendo da divisão em cada país) e 5% em municípios e/ou distritos, quando comparado com o ano de 2017, demonstrando, mais uma vez, a constante expansão geográfica da Leishmaniose. Com relação aos casos registrados em fronteiras, este número não variou entre os anos de 2017 e 2018, sendo registrados 9.510 (20,6%) novos casos em 302 unidades de fronteiras no ano de 2018 (PAHO; WHO, 2019).

Com relação à LV nas Américas, em 2017, ocorreram 4.239 novos casos. Isso representa um aumento de 26,4% em relação ao ano de 2016, sendo que, no Brasil houve um aumento de 28% e na Colômbia e Paraguai uma diminuição de 21% e 47%, respectivamente. Os casos estão distribuídos em 9 países, 56 departamentos/estados e 1029 municípios, elucidando uma expansão geográfica (OPAS; OMS, 2019). Em 2018, foi registrado o primeiro caso de LV em humano no Uruguai. Neste mesmo ano, 3.562 novos casos de LV foram registrados em 9 países, 48 estados/províncias e 974 municípios/ distritos, elucidando uma diminuição de 16% em relação a 2017. Os países que apresentaram uma redução de casos foram: Brasil, Colômbia, Argentina e Paraguai (PAHO; WHO, 2019).

No estado do Rio Grande do Sul, em janeiro de 2009, a Secretaria Estadual da Saúde - SES/RS, notificou o primeiro caso autóctone confirmado de LVH no município de São Borja, seguido pelo município de Uruguaiana (2011), Itaqui (2012), Porto Alegre (2016) e Viamão (2017) (CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE [CEVS], 2017).

Em 2017, aproximadamente 100% dos casos registraram, no programa SisLeish, as variáveis sexo e idade. Assim como nos casos de LC, o sexo masculino foi o mais acometido pela LV (64,6%- 2.739 casos). Já a variável idade apresentou diferença quando comparado com a ocorrência de LC, sendo que os indivíduos mais afetados por LV apresentavam idade entre

20 e 50 anos (32,8%), seguido de menores de 5 anos (31,1%) e, por fim, maiores de 50 anos (17%) (OPAS; OMS, 2019).

A leishmaniose visceral canina (LVC) apresenta caráter de expansão nas Américas. Em um estudo realizado abrangendo 35 estados dos EUA e 4 províncias Canadenses, com a investigação da infecção em cães de clube de caça, foi verificada positividade em 18 estados dos EUA e 2 províncias do Canadá (DUPREY et al., 2006). No México, foi realizado um estudo para avaliação de flebotomíneos infectados e demonstraram o potencial risco de transmissão de *Leishmania (L.) Mexicana* no país (RODRÍGUEZ-ROJAS et al., 2017). O número de cães infectados na América do Sul é estimado em milhões de animais, sendo que a alta prevalência de caninos contaminados é relacionado com os altos índices da afecção em humanos, especialmente no Brasil (BANETH et al., 2008).

O primeiro caso de LVC, registrada pelo Centro estadual de vigilância em saúde, na região Sul do Rio Grande do Sul/Brasil, ocorreu no município de São Borja, fronteira com a Argentina, em 2008. Até este momento, a região era considerada indene para a doença (SOUZA et al., 2009b), com casos relatados apenas em Santa Maria e Cruz Alta (KRAUSPENHAR et al., 2007; POCAI et al., 1998). No estado, os municípios onde ocorrem transmissão em cães incluem: Barra do Quaraí, Uruguaiana, Itaqui, São Borja, Porto Xavier, Santa Cruz do Sul, Porto Alegre e Viamão (CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE [CEVS], 2017).

O município de Uruguaiana, Rio Grande do Sul, localizado na tríplice fronteira (Argentina, Brasil e Uruguai), é considerado endêmico para LVC, tendo em vista a presença de cães infectados na maioria dos bairros da cidade (ESCOBAR et al., 2018). Além disso, a investigação de outras espécies envolvidas na ocorrência e manutenção da doença no local, identificou equinos com presença de material genético de *Leishmania spp.* em amostras de sangue periférico de animais provenientes tanto da zona urbana quanto da zona rural do município (ESCOBAR et al., 2019; PRADELLA et al., 2020). Outro trabalho realizado em cães e equinos incluiu 123 amostras onde, 14 cães e 11 equinos foram positivos no diagnóstico molecular (PCR) e o sequenciamento confirmou a presença de quatro espécies diferentes: *L. infantum/L. chagasi*, *L. donovani* e *L. major* (ESCOBAR et al., 2019). Estes fatos demonstram a necessidade de maiores estudos no local e inclusão de métodos diagnósticos suplementares. Um trabalho realizado por Evers et al. (2017) demonstrou elevada soroprevalência de *Leishmania spp.* em equinos enviados a dois matadouros registrados no Serviço de Inspeção

Federal que recebeu animais provenientes de 6 estados brasileiros (Paraná, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás). A investigação da soroprevalência em Araçatuba (SP) e em Uberlândia (MG), também demonstraram resultados positivos e a necessidade de uma investigação mais aprofundada para determinação da real importância dos equinos no ciclo da doença (FEITOSA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2017).

2.4 Ciclo biológico

O cão doméstico (*Canis familiaris*) é o principal reservatório de diversas espécies de *Leishmania*, desempenhando um papel importante na manutenção do protozoário. Possui participação na transmissão zoonótica de *L. (L.) infantum* já bem definida (DANTAS-TORRES, 2007).

O ciclo biológico está elucidado na FIGURA 3. Os hospedeiros vertebrados tornam-se infectados quando a fêmea do flebotomíneo vetor (*Lutzomyia longipalpis*) regurgita as formas infectantes (promastigotas) no tecido subcutâneo ao se alimentar do sangue. Neste momento as células do sistema reticuloendotelial fagocitam estas partículas no local da picada buscando sua eliminação. As formas promastigotas perdem os flagelos transformando-se em amastigotas dentro de monócitos e macrófagos e, são então carregadas, principalmente, para o fígado, baço e linfonodos. A cada ruptura das células, mais formas amastigotas são liberadas e estão livres para infectar novos macrófagos (CDC, 2020).

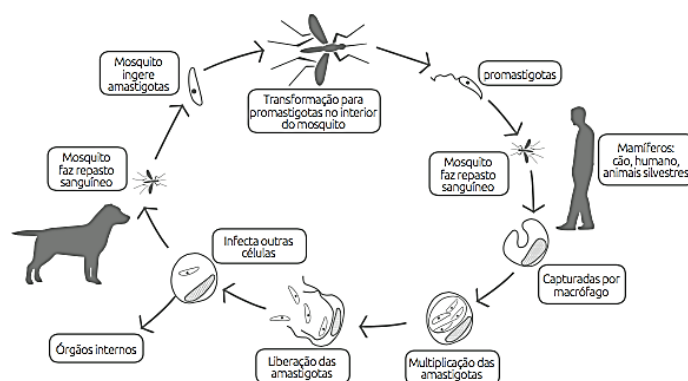


FIGURA 3- Ciclo biológico da Leishmaniose. Fonte: Vet Smart, estudo do Milteforan®.

2.5 O vetor

As diferentes espécies de *Leishmania*, causadoras das leishmanioses, são transmitidas pela picada de flebotomíneos fêmeas. No Novo mundo, o complexo de espécies de *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) são os principais vetores da leishmaniose visceral, e isso é bem elucidado no Brasil (DE SOUZA et al., 2017). No velho mundo, o gênero responsável pela transmissão é o *Phlebotomus* (KEVRIC et al., 2015).

O ciclo de vida do flebotomíneo compreende 4 estágios: ovo, larva, pupa e adulto. As fêmeas depositam seus ovos em locais com umidade e presença de matéria orgânica e, estes passam para o estágio de larva em aproximadamente uma semana. As larvas se desenvolvem durante 20 a 30 dias em locais com matéria orgânica em decomposição, buracos em árvores e/ou locais com dejetos de animais. A fase de pupa dura cerca de 15 dias e, ao final, ocorre o surgimento do flebotomíneo adulto. A longevidade dos adultos é de aproximadamente 27 dias e, sua zona de abrangência, não ultrapassa 200 metros (MAHMUD et al., 2019).

A *Lutzomyia longipalpis* (FIGURA 4) se adapta facilmente as mudanças no ambiente e, tem sido encontrada em áreas peridomiciliares e intradomiciliares. Isso facilita o contato com seres humanos e animais domésticos, aumentando a chance de infecção (BARATA et al., 2005; MAHMUD et al., 2019).



FIGURA 4- Exemplar adulto (fêmea) de *Lutzomyia longipalpis* (Psychodidae: Phlebotominae) exercendo hematofagia. Fonte: Acervo do Laboratório de Leishmanioses "Prof. Dr. Ralph Lainson".

A observação de que a *Lutzomyia longipalpis* compreende um complexo de espécies e não uma espécie única, se deu devido a constatação da existência de diferenças morfológicas, moleculares e bioquímicas em amostras coletadas de diferentes locais (DE SOUZA et al., 2017).

Em um levantamento realizado na zona rural da Amazônia central, Brasil, área endêmica para LC, foi identificado material genético (DNA) de *Leishmania* em diferentes espécies de flebotomíneos nos ambientes intradomiciliares, peridomiciliares e na floresta. De 670 amostras testadas, 54 amostras de 21 espécies diferentes apresentaram DNA de *Leishmania*. Dentre as espécies suspeitas e comprovadas como vetores estão: *Bichromomyia olmeca nociva*, *Bi. Flaviscutellata*, *Nyssomyia anduzei*, *Ny. antunesi*, *Ny. umbratilis*, *Psychodopygus davisii*, *Ps. sq. squamiventris*, *Ps. Ayrozai*, *Ps. Paraensis*, *Lutzomyia gomezi* e *Migonemyia migonei*. A identificação de material genético em flebotomíneos que não são vetores, não comprova que está ocorrendo a transmissão, entretanto, elucida a circulação do protozoário neste ambiente (CHAGAS et al., 2018).

Em Porto Alegre/RS, foi realizada a captura e identificação de 437 flebotomíneos de diferentes espécies. No peridomicílio três espécies predominaram, são elas: *Pintomyia Fischeri* (26,01%), *Mg. migonei* (45,79%), e *Lu. Gaminarai* (17,58%). Foi detectada presença de *L. infantum* pela técnica de PCR nas espécies *Pi. Fischeri* e *Mg. Migonei*, evidenciando sua importância no ciclo (MAHMUD et al., 2019).

O vetor possui hábitos alimentares ecléticos. Um estudo realizado em área endêmica para LV no estado de Mato Grosso identificou flebotomíneos e, por meio de testes de precipitação com diferentes antissoros, definiu que as fêmeas da espécie *L. longipalpis* se alimentaram, predominantemente, em galinhas e equinos, seguido de roedores, cães e homem. Este fato é de importância tendo em vista a presença de diferentes espécies e a manutenção do vetor no ambiente (BARATA et al., 2005).

2.6 Apresentação clínica em caninos e equinos

As diferentes espécies do gênero *Leishmania* causam uma gama de doenças chamadas leishmanioses, estas variam entre padrões epidemiológicos e clínicos desde casos

assintomáticos, lesões na pele até casos graves de comprometimento visceral e morte (DANTAS-TORRES, 2007).

A evolução clínica em cães infectados com *L. (L.) infantum* pode ser observada de diferentes formas: sinais sistêmicos com perda de peso, atrofia muscular, letargia e mucosas pálidas; sinais reticuloendoteliais com esplenomegalia e aumento dos linfonodos; sinais cutâneos onde o animal pode apresentar onicogribose, alopecia, nódulos e/ou úlceras, dermatite seca; sinais oculares como blefarite, ceratoconjuntivite e uveíte; e, por fim, alterações clínico patológicas tais como: anemia, trombocitopenia, hiperglobulinemia e aumento da ureia e creatinina (FOGLIA MANZILLO et al., 2013). Os sinais clínicos mais comuns observados em cães incluem: linfadenomegalia, alopecia, lesões em orelha e/ou focinho, emagrecimento, lesões de pele (FIGURA 5), mucosa pálida e pelo quebradiço (DA SILVA et al., 2017).



FIGURA 5- Leishmaniose em um cão. Animal apresentando lesão periocular causada por infecção ativa de *Leishmania infantum*. Fonte: Ministério da Saúde.

Na espécie equina, a forma cutânea (FIGURA 6) é a mais observada nos casos de infecção por *Leishmania* (AGUILAR et al., 1986). Na Alemanha, foi detectada *L. infantum* em lesões nodulares na face de um equino, as quais regrediram espontaneamente, sem tratamento, em alguns meses (KOEHLER et al., 2002). Casos semelhantes foram descritos na Espanha, onde foi identificada *L. infantum* em lesões de pele de três equinos residentes em área endêmica de LVC e LVH (SOLANO-GALLEGO et al., 2003). Ademais, a grande maioria dos casos relatados de equinos positivos, ocorrem de forma assintomática, sendo detectados apenas em

levantamento epidemiológico (ESCOBAR et al., 2020; ESCOBAR et al., 2019; EVERS et al., 2017; FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006; PRADELLA et al., 2020).

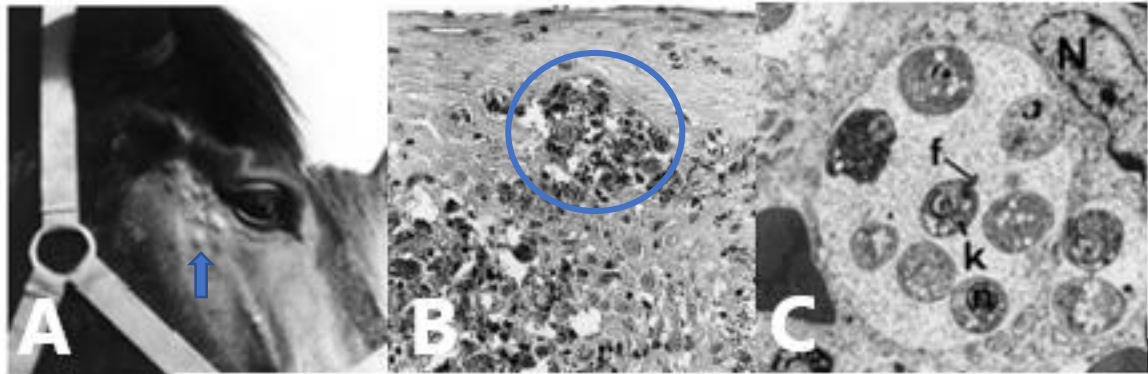


FIGURA 6- A) Equino apresentando a forma cutânea da Leishmaniose com múltiplos nódulos na derme, região ventral ao olho direito (seta). B) Granuloma inflamatório subdermal (círculo) com presença de macrófagos. C) Micrografia eletrônica da pele evidenciando a presença de formas amastigotas de *Leishmania sp.* em macrófagos. Fonte: KOEHLER et al., 2002.

2.7 Diagnóstico

Dentre as técnicas diagnósticas, podem ser citados os métodos: parasitológico (DE SOUSA et al., 2017; SARIDOMICHELAKIS et al., 2005), molecular (ESCOBAR et al., 2019, 2020) e sorológico (AISA et al., 1998; FIGUEIREDO et al., 2018).

O teste parasitológico, exame direto com a observação das formas amastigotas, é considerado o padrão ouro no diagnóstico da leishmaniose, apresentando 100% de especificidade. Porém, estudos demonstram que sua sensibilidade varia amplamente dependendo da qualidade da amostra coletada e da experiência do profissional que avalia o material em lâmina (PESSOA-E-SILVA et al., 2019; SARIDOMICHELAKIS et al., 2005). As lâminas são preparadas a partir de aspirados de linfonodos, coleta de medula óssea ou baço, realizando-se um esfregaço em lâmina e, posteriormente, a coloração com Giemsa. A observação é feita em microscópio óptico em objetiva de 1000 x. Esta técnica é considerada de fácil execução, rápida e de baixo custo, entretanto, é de extrema importância que a coleta seja realizada de forma adequada bem como a avaliação do material (DE SOUSA et al., 2017; PESSOA-E-SILVA et al., 2019).

Além da observação das formas amastigotas do parasito em lâmina, a técnica de cultivo celular de amostras provenientes de aspiração de linfonodos, sangue ou medula óssea possibilita, em animais positivos, a visualização das formas promastigotas da *Leishmania*, permitindo o diagnóstico e posterior avaliação da espécie envolvida no caso (CAVALIERO et al., 1999; MADEIRA et al., 2006). Além disso, é possível realizar o cultivo a partir de fragmentos obtidos de biopsias de pele (FIGUEIREDO et al., 2018).

Com relação ao diagnóstico molecular, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é amplamente utilizada em pesquisas e como técnica diagnóstica para diversas afecções. Ela permite a detecção de quantidades pequenas de DNA do parasito (*Leishmania spp.*) e possibilita a identificação de animais positivos com alta sensibilidade, mesmo em casos assintomáticos ou com testes imunológicos negativos (INIESTA et al., 2002; LACHAUD et al., 2002).

Dentre os exames sorológicos, podem ser citadas técnicas indiretas, que identificam a resposta imune do animal como: imunoensaio cromatográfico de plataforma dupla (DPP® Teste rápido LVC) (FIGUEIREDO et al., 2018); reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (OLIVEIRA et al., 2017); western blot (AISA et al., 1998) e ELISA (CAVALIERO et al., 1999; DEPLAZES et al., 1995).

O teste rápido DPP® (Dual-path Platform chromatographic immunoassay) foi registrado em 2011 pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e é produzido pelo laboratório Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz, composto por uma mistura de proteínas recombinantes (k26 e k39) representativas de regiões antigênicas de *Leishmania chagasi*. Foi atribuído como teste de triagem, em substituição à RIFI, pelo Ministério da Saúde, devido a sua facilidade de aplicação, rapidez e eficiência (MINISTÉRIO DA SAÚDE [MS], 2011). Um estudo realizado com 1446 cães de diferentes cidades brasileiras, endêmicas para leishmaniose, confirmou a eficácia do teste rápido e sua segurança para utilização em estudos sorológicos. Neste mesmo trabalho, foi observado que a sintomatologia, de alguma forma, interfere na performance do teste (FIGUEIREDO et al., 2018).

O uso da técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) para diagnóstico sorológico de leishmaniose já é estudada a muitos anos. Um trabalho de padronização desta técnica foi realizado em 1965 utilizando diferentes antígenos, métodos de fixação e amostras (BRAY; LAINSON, 1965). Uma investigação utilizando antígeno de *Leishmania* solúvel em detergente para as técnicas de RIFI e ELISA, encontraram resultados semelhantes entre as duas técnicas

com relação a sensibilidade e especificidade dos testes, considerando ambos válidos para o diagnóstico. Contudo, o teste de ELISA apresentou maior reprodutibilidade e rapidez, o que o torna mais viável em investigações mais extensas (MANCIANTI et al., 1995).

A triagem dos casos de LVC era realizada utilizando ELISA e, como teste confirmatório, RIFI, como preconizado pelo Ministério da Saúde. Com o desenvolvimento do teste rápido (DPP®), este foi eleito como teste de triagem e, então, a RIFI foi substituída pela técnica de ELISA devido a capacidade de realização de um número maior de amostras e, ainda, leitura automatizada (MS, 2011).

Outra técnica sorológica disponível é o western blot, que se baseia na separação de proteínas, de acordo com o peso molecular, em gel submetido a eletroforese. Este é transferido para uma nova membrana e incubado com o soro a ser testado para identificação da reação desejada de acordo com o antígeno testado (MAHMOOD & YANG, 2012). Um estudo avaliando o potencial da técnica western blot no diagnóstico de leishmaniose em cães, encontrou alta sensibilidade (95.8%) e especificidade (100%) quando utilizadas bandas de antígeno com peso molecular de 12, 14, 28, 30, e 46 kD (AISA et al., 1998).

A técnica de ELISA foi desenvolvida, em meados de 1960, por Peter Perlmann, como principal investigador, e Eva Engvall na Universidade de Estocolmo, Suécia (LEQUIN, 2005). No ano de 1978 foi realizado um estudo com amostras de cães e seres humanos, diagnosticados com LV (tendo como base os resultados da clínica e RIFI destes pacientes), definindo a confiabilidade da técnica micro-ELISA. Foi realizada a fixação das placas com *L. infantum* isolada de um caso humano e, posteriormente, as amostras foram testadas. Foi comprovada a eficácia deste teste no diagnóstico de LV, sendo necessários mais estudos para detecção de LC (HOMMEL et al., 1978).

A partir deste período, diversos estudos foram realizados buscando padronizar a técnica de ELISA com o melhor antígeno. Em outro estudo, comparando os resultados com o western blot, utilizou-se como antígeno *L. donovani* e os testes foram desenvolvidos com soro humano, sendo os resultados considerados satisfatórios (MARTIN et al., 1998). A espécie *L. chagasi*, também já foi utilizada para fixação de placas de ELISA, e os testes foram realizados com soro de cães domésticos e canídeos silvestres demonstrando eficácia na técnica (FERREIRA et al., 2013).

Pode-se realizar a fixação de antígenos para a técnica de ELISA utilizando formas promastigotas de *Leishmania spp.* em cultivo. No protocolo in natura existem algumas

variações de técnicas, porém, todas têm como objetivo a eliminação do meio de cultura e lavagem das células com tampão fosfato-salino (PBS) seguido da inativação das *Leishmanias* pelo método térmico (quente/frio) e, posteriormente, pode ser realizada a ruptura das células pela técnica de sonicação (FERREIRA et al., 2013; MANCIANTI et al., 1996; RAJASEKARIAH et al., 2001).

Foram desenvolvidas proteínas recombinantes denominadas PQ10 e PQ20, para utilização no diagnóstico precoce de leishmaniose em caninos, em ensaios de ELISA. Para avaliar a eficácia das proteínas recombinantes, no mesmo ensaio, foi utilizada a fixação de antígeno cru (formas promastigotas de *L. infantum*) para avaliação dos resultados entre estes grupos. Ao final das análises, os pesquisadores elucidam que a sensibilidade/especificidade das placas fixadas com PQ10 foi de 93.1% e 80.0%, com PQ20 os valores variaram de 93.1% a 96.6%, e com o antígeno cru houve uma redução significativa para 75% e 73.3%, respectivamente (FONSECA et al., 2019).

As proteínas recombinantes demonstraram maior eficácia no teste de ELISA para caninos (FONSECA et al., 2019), contudo, a utilização de antígeno cru proveniente de cultivo de *Leishmania spp.* vêm sendo utilizada para padronização do teste em equinos e diferentes espécies, se mostrando uma técnica promissora e de baixo custo para o imunodiagnóstico de leishmaniose (FERREIRA et al., 2013; GAZZONIS et al., 2020; MANCIANTI et al., 1996; MARTIN et al., 1998; RAJASEKARIAH et al., 2001).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Padronização da técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireta para a detecção de anticorpos anti *Leishmania* em equinos e caninos.

3.2 Objetivos específicos

- Padronização do ensaio de ELISA indireto para a espécie equina com o intuito de identificar animais sororeagentes para *Leishmania spp.*
- Padronização do ensaio de ELISA indireto para a espécie canina com o intuito de identificar animais sororeagentes para *Leishmania spp.*
- Realização de teste sorológico de equinos e caninos residentes nas áreas urbana e rural dos municípios de Barra do Quaraí e Uruguaiana/RS.

4 CAPÍTULO 1- Manuscrito

In-house serological diagnosis from *Leishmania infantum* culture: Development and Applications in horses and canines.

Gabriela Döwich Pradella

Artigo científico a ser submetido à revista Preventive Veterinary Medicine

Highlights

- 1) Optimization of an in-house indirect ELISA technique to serodiagnosis of leishmaniasis in equine and canine from Western border Brazil;
- 2) Use of crude antigen (*Leishmania infantum*) to develop an in-house ELISA;
- 3) Positive serodiagnosis of equine and canine leishmaniasis from Uruguaiana and Barra do Quaraí cities;

Abstract

Leishmaniosis causes a great public health problem affecting humans and animals. The disease is caused by the protozoan *Leishmania spp.* which has a complex cycle involving a phlebotomine vector. The ELISA test (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) was defined as the health ministry's definitive methodology in 2011. It allows the identification of the immune response through antibody-antigen binding. The present study aimed to standardize an "in house" indirect ELISA protocol for the detection of an immune response to *Leishmania spp.* in canine and equine species, as well as the serological evaluation of 51 canines and 159 equine samples from western border Brazil (Uruguaiana and Barra do Quaraí city). For both species, the antigen concentration of 10ug of *L. infantum*/ml in plate fixation showed better results. The plates' blocking was performed using different solutions under varying times and temperatures to define the ideal condition. Among them, 1% nonfat dried milk (Molico®) in the volume of 300ul/well at 37°C for 90 minutes was the most effective. The 1st dilution was defined as 1/200 for horse and 1/800 for dog sample. With these conditions, it was possible to obtain a signal to noise value of 7,27; cut off 0,749; negative control means 0,232, and positive control means 1,688 for a canine sample. To horses these values varied with signal to noise 3,496; cut off 0,360; negative control means 0,246 and positive control mean 0,860. Among the 51 canines tested, 17 were positive in the ELISA technique. Regarding the tested horses, 159 animals, 16 were positive in the ELISA. Thereby, it can be concluded that it was possible to standardize an ELISA protocol "in-house" to diagnose leishmaniasis in horses and canines from the definition of ideal conditions. 33% of positive canines (17/51) and 10% of horses (16/159) were detected, demonstrating that the disease circulates in the studied population.

Keywords: *Leishmania sp.*; Diagnostic; Public health; Horse;

Introduction

Leishmaniosis is a zoonotic disease that is at the top of the list of globally neglected diseases. Annually 12 million people are infected, and 20.000 to 30.000 dies. Most cases in 2017 occurred in seven countries worldwide, and Brazil was one (World Health Organization [WHO], 2018).

The domestic dog (*Canis familiaris*) is the main reservoir of different species playing an essential role in protozoan maintenance. Its participation in the zoonotic transmission of *Leishmania Infantum* was well defined (Dantas-Torres, 2007).

Leishmaniosis is a disease that is spreading and establishing itself in different ecosystems in South America, which is why it is considered an emerging infection in the outer south region of Brazil (Pan American Health Organization [PAHO]; World Health Organization [WHO], 2019). The first reported case of canine visceral leishmaniosis in Argentina-Brazil's border region was in São Borja municipality in 2008 (Souza et al., 2009b). Next year, the wealth estate secretary notified a human visceral leishmaniasis case. Uruguaiiana city registered the first human case in 2011 (Centro Estadual De Vigilância Em Saúde [CEVS], 2017).

The biological cycle of Leishmaniosis is well known when related to dogs; however, another species can be involved as a reservoir of *Leishmania* protozoan. Previously in Uruguaiiana city, horses were detected positive in rural and urban areas through molecular analysis of peripheral blood samples. These data suggest the equine species' possible participation in the *Leishmania* biological cycle (Escobar, et al., 2019; Pradella, et al., 2020; Felipe et al., 2020).

In general, to diagnose, the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) technique has been widely used and demonstrates an optimal practical application to detect immunological response against *Leishmania spp.* (Hommel, 1976). It can be made in-house by the leishmanial culture and standardization of the technique or acquired from companies with this species available (Rajasekariah et al., 2001).

This study's objective was to standardize an in-house indirect ELISA Leishmaniasis serodiagnosis to equine and canine samples using crude antigen of *Leishmania infantum*. The serological evaluation of equine and canine samples from the western border of Rio Grande do Sul/Brazil was carried out.

Material and methods

Leishmania infantum cell culture

The *Leishmania infantum* (2906) strain was made available from FRIOCRUZ/RJ, and the culture was according to their manual, with modifications (Ministério Da Saúde [Ms]; Fundação Oswaldo Cruz [FIOCRUZ], 2018). To cell culture, two different mediums were utilized, a solid and a liquid one. The solid phase was composed of Brain heart infusion agar (BHI) supplemented with sheep defibrinated blood in a 15% concentration. In every 7,5 ml of blood, it was added 100µl of penicillin/streptomycin (10.000 U/ml penicillin and 10 mg/mL streptomycin) and 150µl of gentamicin (40mg/ml). The liquid phase was a compound of Schneider's with 2ml of bovine fetal serum (BFS), 1,25 ml of glutamine (200mM), 125µl of gentamicin (40 mg/ml), and 20 µl human urine each 20ml medium. The strains were transferred to a new tube with BHI blood and 800 µl of the liquid phase weekly and incubated in biochemical oxygen demand (BOD) at 25°C. Evaluation of *Leishmania* cell was performed by optical microscopy (OM) to observe contaminating and cell viability.

Antigen preparation

The methodology was according to previous studies with modifications (Soares, 2012). In a cell-growing bottle was added, the sloping solid medium occupying the entire bottom of the container. The liquid phase was added, and the medium stabilized at 25°C in the BOD incubator. The cells were transferred from the culture tubes to the bottle, and their viability was evaluated in OM. Incubation was performed for 72 hours in BOD until the cells reached the stationary phase. After this period, the liquid phase was transferred to a falcon, according to the volume acquired. A sample was evaluated in OM to determine the viability of the cells and the absence of contamination. The liquid phase was centrifuged at 4000rpm at four °C for 10 minutes, and three washes with saline phosphate buffer (PBS) were performed to remove the residues from the medium. The cells were soon inactivated by thermal shock using a water bath at 60°C and liquid nitrogen. The 10-minute protocol was used in a water bath at 60°C followed by 10 minutes in liquid nitrogen, a procedure performed twice. Subsequently, visual inspection was done in OM to ensure that there were no viable cells and, the material obtained was submitted to protein reading by the Bradford method.

Bradford curve for protein determination

A Bradford curve (ThermoFisher scientific®) was used to perform protein reading (Bradford, 1976). The standard curve was performed with bovine serum albumin (BSA) at 3mg/ml. The concentrations used were 0.1 to 1 mg/ml of BSA in distilled water. In 1ml of Bradford solution, 20µl of dilution (0.1 to 1) was added to perform the reaction. The samples were homogenized, and at least 5 minutes later, the reading was performed in a spectrophotometer at 595nm. The data obtained were recorded in excel (Excel Microsoft®). From the data, the value of R^2 was calculated, which should always be close to 1 to be reliable, and thus the formula for calculating the protein concentration in the desired sample was generated. The material obtained in the antigen preparation was homogenized and submitted to the Bradford test. To perform the reaction, 20µl of the sample was added to 1ml of Bradford solution, the samples were homogenized and waited at least 5 minutes for reading. The reading was performed in a spectrophotometer at 595nm.

Antigen concentration

The antigen was diluted in coating buffer (bicarbonate carbonate pH 9.6). The concentrations used in the tests varied among the species, for horses it was 0.25 µg/ml; 0.5 µg/ml; 1 µg/ml; 2.5 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml; 20 µg/ml and 40µg/ml; and for canines 5 µg/ml; 10 µg/ml; 20 µg/ml and 40 µg/ml. The antigen was added in ELISA plates at 100ul/well volume. Subsequently, the plates were packed with plastic film and incubated overnight at 4°C (refrigerator) to fix the antigen. After this period, the plates were washed with washing solution (0,05% Polysorbate/Tween 20; 0,9% Sodium chloride [NaCl] in distilled water) 4 times in the microplate washer. The methodology was according to previous studies with modifications (Soares, 2012).

Blocking

The blocking was performed differently by testing the best solution, volume, and blocking time (Table 1).

Table 1: Blocking techniques used for antigen fixation. Presentation of different solutions, volume/well, temperature, and time tested.

Blocking solution	Volume/well	Temperature (°C)	Time (hours)
Casein 2%	150µl	37	0,5
Casein 5%	150µl	37	0,5
NFDM* 1%	150µl	37	0,5
NFDM*10%	150µl	37	0,5
NFDM* 1%	300µl	37	0,5
Inactivate serum 2%	300µl	37	0,5
NFDM* 1%	300µl	37	1
Inactivate serum 2%	300µl	37	1
Bovine albumin 2%	300µl	37	1,5
NFDM*1%	300µl	37	1,5

*NFDM – Nonfat Dried Milk (Molico®, Nestle)

After the blocking, the plate was washed twice with a solution in a microplate washer. Samples were packed in aluminum foil and stored at -20°C until use.

Biological samples

The biological samples tested are part of the PPSUS project (Research Program for the Health Unic System: shared health management). A total of 159 horses and 51 canines were collected from the urban and rural areas of the municipality of Uruguaiana/RS and Barra does Quaraí/RS. Blood was collected by venipuncture of the external jugular in horses and the jugular or cephalic in canines and stored in tubes with EDTA and without anticoagulant. The blood was centrifuged at 1500 rpm for 20 minutes or until the complete separation of the serum. The serum was stored in tubes of 2 ml and frozen at -20°C.

All canine samples were submitted to the rapid test dual-path platform chromatographic immunoassay (DPP-BioManguinhos®), for canine visceral leishmaniosis from Oswaldo Cruz foundation, according to the manufacturer's instructions.

Equine positive serum was raised from a hyperimmunized horse with *L. infantum* antigen, protocol accepted in the ethics committee (CEUA 22/2017 and 14/2020), and equine serum

from non-endemic areas negative control. Different concentrations were used for the 1st antibody dilution test: 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, and 1/1000.

The positive control for dogs was serum of two positive animals (Immunocromatography and PCR) from endemic areas. The negative control was two dogs from non-endemic regions tested in Immunocromatography and PCR. The 1st antibody dilution tests were: 1/100, 1/400, and 1/800 for canines.

The blank controls for primary and secondary antibodies were included to verify the presence of an unspecific reaction.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) – indirect assay

The ELISA protocol used for equine and canine species was the same. The plates were pre-coated with *Leishmania infantum* antigen. Initially, the 1st antibody dilution (serum of the animal to be tested) was diluted in phosphate-saline dilution buffer (PBS) supplemented with 0.05% polysorbate 20 (PBS Tween) and 0.25% casein, at a concentration 1/200 for equine and 1/800 to dog sample. Next was added 100ul/well of the diluted sample in the plate with the desired concentration. The plate was gently shaken and incubated for 45 minutes at 37°C (Thermo-Shaker Agimaxx®). After that, washing in a microplate washer (Wellwash- Thermo Fisher Scientific®) with PBS tween was performed using four cycles. The next step was the addition of 100ul/well of the 2^o antibody, specie specific (Goat Anti-Dog IgG H&L [HRP] ab112852 and Rabbit Anti-Horse IgG H&L [HRP] ab102405- Abcam®) in PBS Tween. The concentration used was 1/10000 for horses and canines. The plate was again gently stirred and incubated for 45 minutes at 37°C. The last wash was performed in a microplate washer with PBS tween using four cycles, and 100ul/well of the substrate solution (Tetramethylbenzidine-TMB) was added and incubated for 15 minutes in the dark. The reaction was finalized with the addition of 25ul/well of the stop solution (Sulfuric Acid 2M). Finally, the reading was performed according to the manufacturer's instructions of the development solution (TMB) with an ELISA reader (Multiskan FC- Thermo Fisher Scientific®) at 450nm.

Cut-off determination

The ideal conditions for the immunodiagnostic assay's performance was obtained from the mean absorbance of positive and negative controls (signal-to-noise). The cut-off was

determined with the mean absorbance of negative controls plus three times de standard deviation of negative controls (Rajasekariah et al., 2001). It was established negative and positive samples if the absorbance value was 10% below or above the cut-off. Samples with values inside the cut-off determination were considered undetermined.

Results

Coating and blocking

The protocol used to the *Leishmania infantum* cell culture and antigen preparation enabled the detection of a serological response against *Leishmania sp.* in the animal species studied. Between the blocking tests applied, the effective one was reached with the use of 300µl/well of nonfat dried milk (Molico[®]) and posterior incubation at 37°C for 90 minutes to equine samples and, for 1 hour to canine samples.

Equine sample ELISA standardization

After the blocking definition for 90 minutes, it was possible to evaluate the equine sample ELISA's best antigen concentration. The tested antigen concentrations were defined 10µg/ml as the appropriate one for the species. The signal to noise was 3,496; cut off 0,360; negative control mean 0,246 and positive control mean 0,860. The 1st antibody dilution in equine serum was 1/200 concentration. The 2° antibody or conjugated conjugate concentration was the same defined for the dog sample (1/10000).

Canine sample ELISA standardization

Through different antigen concentration used for dog plate ELISA (5 µg/ml; 20 µg/ml and 40 µg/ml), it was observed, by the controls, that 10 µg/ml evidence best differentiation between the negative and positive controls with the signal to noise value of 7,27; cut off 0,749; negative control mean 0,232 and positive control mean 1,688. Besides that, the white control showed low OD counting (0,040- 0,100) compared to the other plates. Concerning the first antibody dilution (serum of the animal to be tested), 1/800 demonstrates the best results. Furthermore, it was possible to visualize the importance of casein in the dilution by observing the blank controls. The 2° antibody concentration defined for canine species was 1/10000.

Tests on biological samples

Of the 51 canine samples tested, 17 were positive in the ELISA technique. From these animals, 16 were also positive in rapid test DPP® (Dual-path Platform chromatographic immunoassay), acquired from Oswaldo Cruz Foundation. Regarding the equine species, 159 horse serums were tested, and, from these, 16 positive samples were detected.

Discussion

The standardization of an in-house indirect ELISA to Leishmaniosis diagnostic using crude antigen (*Leishmania infantum*) was successful. It allowed the evaluation of samples of horses and canines from the municipalities of Uruguaiana and Barra do Quaraí.

The dog's ELISA technique was quickly developed because it had a better immunological response in the positive controls. In 2011, the Brazilian Ministry of Health defined the rapid test (Dual-path Platform chromatographic immunoassay) as the screening test and ELISA to confirmation (Ministério Da Saúde [MS], 2011). In this study, it was possible to evidence the strong correlation between these techniques.

The use of promastigote antigens has been reported in the human visceral diagnostic; however, the *Leishmania donovani* species was elected. It is possible to note the difference between the assays concerning the plate antigen fixation, blocking, serum dilution, and incubation time (Rajasekariah et al., 2001). It shows the need for standardization of the ELISA technique for each species, site, and laboratory research, defining the best protocol to be used. The most significant difficulty faced during the ELISA assay standardization was the maintenance of *Leishmania* strains in the laboratory to prepare the antigen.

A work comparing the crude antigen with recombinant antigen (rK-39 and rK-26), for canine visceral diagnostic noted that sensitivity was similar in both groups (97% and 100%, respectively). However, the crude antigen demonstrates a higher cross-reactivity than recombinant (Do Rosário et al., 2005), which can be related to low specificity (Cota et al., 2013). In this study, the dog samples tested were submitted to another test (DPP®) to confirm the *Leishmania* infection. The use of recombinant proteins instead of crude antigen was beginning promising in the canine visceral leishmaniosis diagnostic (Faria et al., 2015; Fonseca et al., 2019).

The full participation of horses in the *Leishmania* biological cycle was being studied worldwide with seroprevalence evaluations in the equine populations (Gazzonis et al., 2020; Kouam et al., 2010; Limeira et al., 2019; Lopes et al., 2013). Indirect ELISA for the horse was reported using promastigote antigen in 2.5 mg/ml concentration of *L. infantum*, serum dilution 1/300, and secondary antibodies 1:30000 (Kouam et al., 2010). In this study, *L. infantum* was used too; the differences between dilutions and concentrations were related to the technique and specific location and laboratory differences.

A meta-analysis study on occurrences of leishmaniasis in equids showed, between 18 selected articles, four used ELISA to diagnose (Limeira et al., 2019). In all of them, the protocols were developed with *L. infantum* antigen (synonymous with *L. chagasi*) and, one was used protein rk 39 (Feitosa et al., 2012; Fernández-Bellon et al., 2006; Kouam et al., 2010; Truppel et al., 2014).

The evaluation of positive equine serum samples in the western border of Brazil and correlated with the already published articles (Escobar et al., 2020; Escobar et al., 2019; Feitosa et al., 2012; Kouam et al., 2010; Limeira et al., 2019; Lopes et al., 2013; Pradella et al., 2020), demonstrate the importance to define the real participation of this species in the maintenance of *Leishmania* and the definition of the capacity to infected phlebotomy vector.

Conclusions

Serodiagnosis using in-house ELISA with crude antigen was possible after the standardization and definition of best conditions for each species. The antigen concentration of both species was 10µg/ml of *Leishmania infantum*. Canine samples showed 33% (17/51) positive and equine 10% (16/159) positive animals.

Ethics approval

The Ethics committee approved the protocol for research animal use (CEUA) from Unipampa with number 014/2020.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Funding

This work was supported by FAPERGS/PPSUS (Research Program for SUS: Shared Health Management - PPSUS 2017), who makes possible the research development.

The *Leishmania* strains were kindly provided by FIOCRUZ/RJ, enabling the development of this work.

References

- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitating microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248.
- Centro Estadual de Vigilância em Saúde [CEVS], 2017. Situação Epidemiológica da Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul. Gov. do estado do Rio Grande do Sul/Secretaria de saúde 1–4.
- Cota, G.F., De Sousa, M.R., De Freitas Nogueira, B.M., Gomes, L.I., Oliveira, E., Assis, T.S.M., De Mendonca, A.L.P., Pinto, B.F., Saliba, J.W., Rabello, A., 2013. Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: A cross-sectional delayed-type study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 89, 570–577. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0239>
- Do Rosário, E.Y., Genaro, O., França-Silva, J.C., Da Costa, R.T., Mayrink, W., Reis, A.B., Carneiro, M., 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 197–203. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762005000200015>
- Escobar, T.A., Döwich, G., Cantele, L.C., Góss, G.C., Porciúncula, M.L., Leite, C.T., Zuravski, L., Duarte, C.A., Lübeck, I., 2020. Applications of polymerase chain reaction for the detection of equine *Leishmania* sp. *Infection. Semin. Agrar.* 41, 199–211. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n1p199>
- Escobar, T.A., Dowich, G., Dos Santos, T.P., Zuravski, L., Duarte, C.A., Lübeck, I., Manfredini, V., 2019. Assessment of *Leishmania infantum* infection in equine populations in a canine visceral leishmaniosis transmission area. *BMC Vet. Res.* 15, 381. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2108-1>
- Escobar, T., Dowich, G., Cantele, L.C., Zuravski, L., Ferrareze, P.A.G., Duarte, C.A., Kmetzsch Rosa e Silva, L., Lübeck, I., Manfredini, V., 2020. Molecular detection of *Leishmania* spp. in Brazilian cross-border south region mammalian hosts. *Transbound.*

- Emerg. Dis. 67, 476–480. <https://doi.org/10.1111/tbed.13361>
- Faria, A.R., de Castro Veloso, L., Coura-Vital, W., Reis, A.B., Damasceno, L.M., Gazzinelli, R.T., Andrade, H.M., 2015. Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum*-Infected Dogs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 13–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003429>
- Feitosa, F.L.F., Leal, J., Mendes, L.C.N., Peiró, J.R., Perri, S.H. V, de Lima, V.M.F., Marcondes, M., 2012. Estudo soropidemiológico de leishmaniose em equinos na região de Araçatuba-SP, Brasil, área endêmica para leishmaniose visceral. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 49, 500–502.
- Fernández-Bellón, H., Solano-Gallego, L., Bardagí, M., Alberola, J., Ramis, A., Ferrer, L., 2006. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet. Parasitol.* 135, 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.09.007>
- Fonseca, T.H.S., Faria, A.R., Leite, H.M., Silveira, J.A.G., Carneiro, C.M., Andrade, H.M., 2019. Chemiluminescent ELISA with multi-epitope proteins to improve the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet. J.* 253, 105387. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.105387>
- Gazzonis, A.L., Bertero, F., Moretta, I., Morganti, G., Mortarino, M., Villa, L., Zanzani, S.A., Morandi, B., Rinnovati, R., Vitale, F., Manfredi, M.T., Cardoso, L., Veronesi, F., 2020. Detecting antibodies to *Leishmania infantum* in horses from areas with different epizooticity levels of canine leishmaniosis and a retrospective revision of Italian data. *Parasites and Vectors* 13, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04385-8>
- Kouam, M.K., Diakou, A., Kantzoura, V., Papadopoulos, E., Gajadhar, A.A., Theodoropoulos, G., 2010. A seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Echinococcus* and *Trichinella* in equids in Greece and analysis of risk factors. *Vet. Parasitol.* 170, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.004>
- Limeira, C.H., Alves, C.J., De Azevedo, S.S., Santos, C.D.S.A.B., De Melo, M.A., Soares, R.R., Barnabé, N.N.D.C., Rodrigues, G.D.Q., 2019. Clinical aspects and diagnosis of leishmaniasis in equids: A systematic review and meta-analysis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 28, 574–581. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019074>
- Lopes, A.P., Sousa, S., Dubey, J., Ribeiro, A.J., Silvestre, R., Cotovio, M., Schallig, H.D.F.H., Cardoso, L., Cordeiro-Da-Silva, A., 2013. Prevalence of antibodies to *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii* in horses from the north of Portugal. *Parasites and Vectors* 6, 9–12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-178>
- Ministério da Saúde [MS], 2011. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico

- da leishmaniose visceral canina. Nota técnica conjunta nº 01/2011.
- Olías-Molero, A.I., Moreno, I., Corral, M.J., Jiménez-Antón, M.D., Day, M.J., Domínguez, M., Alunda, J.M., 2020. Infection of dogs by *Leishmania infantum* elicits a general response of IgG subclasses. *Sci. Rep.* 10, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75569-6>
- Pan American Health Organization [PAHO]; World Health Organization [WHO], 2019. *Leishmaniases - Epidemiological Report of the Americas - Nº8* 8, 1–10.
- Pradella, G.D., Escobar, T.A., Duarte, C.A., Lübeck, I., Góss, G.C., Felipe, L., Lagreca, J., Heckler, G.F., Camargo, L.P., Romero, B.G., 2020. Identification of *Leishmania* spp . in horses and a dog from rural areas of Uruguaiana , Rio Grande do Sul , Brazil. *Semin. Agrárias* 41, 2687–2694. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n6p2687>
- Rajasekariah, G.H.R., Ryan, J.R., Hillier, S.R., Yi, L.P., Stiteler, J.M., Cui, L., Smithyman, A.M., Martin, S.K., 2001. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *J. Immunol. Methods* 252, 105–119. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00341-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00341-6)
- Soares, I.R., 2012. Avaliação clínica e laboratorial de equinos sororreagentes para *Leishmania* sp . no município de Belo Horizonte , Minas Gerais , Brasil. *Esc. Veterinária- UFMG* 132.
- Truppel, J.H., Otomura, F., Teodoro, U., Massafra, R., Da Costa-Ribeiro, M.C.V., Catarino, C.M., Dalagrana, L., Ferreira, M.E.M.C., Thomaz-Soccol, V., 2014. Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas? *PLoS One* 9, 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093731>

5. DISCUSSÃO GERAL

As leishmanioses causam sério agravo a saúde pública, acometendo humanos e animais. Por ano, mundialmente, ocorrem cerca de 20-30 mil mortes em decorrência da doença em humanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO], 2018). No município de Uruguaiana, região de tríplice fronteira (Brasil/Argentina/Uruguai), a doença é considerada endêmica, pois, existem cães infectados na maior parte da cidade, tendo notificação de LVC em 24 de 25 bairros da cidade (ESCOBAR et al., 2018).

Além da identificação de caninos infectados por *Leishmania spp.* na região, estudos elucidaram a presença de material genético do parasita em amostras de sangue periférico provenientes da espécie equina, na zona urbana e rural de Uruguaiana (ESCOBAR et al., 2020; ESCOBAR et al., 2019; PRADELLA et al., 2020). Estes dados fortalecem os achados do presente estudo onde, de 159 equinos testados, 16 apresentaram-se sorologicamente reagentes na técnica de ELISA utilizando o antígeno cru de *Leishmania infantum*.

A utilização de técnicas diagnósticas como avaliações sorológicas, permitem a realização de levantamentos epidemiológicos em populações, pois, na técnica de ELISA, é possível o processamento de muitas amostras, em um curto período de tempo, com a realização de leitura automatizada (BASURCO et al., 2020; FUKUTANI et al., 2014).

A padronização da técnica de ELISA “*in house*” possibilita a utilização de antígeno cru, cultivo de *Leishmania spp.*, ou desenvolvimento de proteínas recombinantes para fixação em placas (DO ROSÁRIO et al., 2005; FONSECA et al., 2019). Sabe-se que, o uso de proteínas recombinantes apresenta melhores resultados com relação a sensibilidade e especificidade, quando comparada ao uso de antígeno cru (FONSECA et al., 2019). Contudo, a fixação das placas utilizando cultivo de *Leishmania spp.*, possibilita o desenvolvimento e a utilização da técnica de ELISA mesmo quando não existe a possibilidade de desenvolvimento de proteínas recombinantes no local. Esta técnica tem se mostrado promissora e, como observado neste estudo, possibilita a padronização e utilização em locais com menor infraestrutura.

A padronização da técnica para a espécie canina foi obtida de forma mais rápida, quando comparada com os equinos. Este fato pode ser relacionado com uma maior resposta imune humoral em cães e, também, maiores estudos na espécie, o que facilita a comparação de dados e avaliação dos resultados (DO ROSÁRIO et al., 2005; NETO et al., 2010; PEIXOTO et al.,

2015; SILVA et al., 2013). Além disso, a disponibilidade do teste rápido para LVC (DPP-Biomanguinhos®), validado em estudos anteriores (FIGUEIREDO et al., 2018), permitiu a realização de uma triagem nas 51 amostras caninas testadas e, definição dos controles de forma mais acurada. As leituras obtidas na técnica de ELISA para cães, se apresentaram de forma claramente distinta entre animais positivos (média 1,688) e negativos (média 0,232), corroborando também, com os resultados do teste rápido realizado. Do total de 51 caninos testados, 17 foram reagentes na técnica de ELISA e, destes, 16 apresentaram positividade também no teste imunocromatográfico (DPP®).

A padronização do ELISA para a espécie equina, apresentou maiores dificuldades, pois, como não há disponibilidade do teste rápido para a espécie, não foi possível definir os controles positivos e negativos, como realizado em cães. Tendo em vista este fator, foi necessária a realização de hiperimunização, utilizando *Leishmania infantum* inativada, em um equino, para controle positivo. As aplicações eram realizadas em intervalos de 15 dias, totalizando 4 doses. Três animais provenientes de área não endêmica (Santana do Livramento/RS), foram utilizados como controles negativos. Após este procedimento foi possível a padronização onde, as melhores leituras dos controles negativo e positivo foram de 0,246 e 0,860, respectivamente. Em um estudo avaliando a soroprevalência em 466 equinos no estado de São Paulo, testados para a presença de IgG anti-*Leishmania chagasi* pelo método de ELISA, 68 (14,59%) apresentaram sororeatividade e, os títulos variaram entre 0,324 e 0,813 (FEITOSA et al., 2012).

Um trabalho realizado na Espanha, avaliou a resposta imune celular e humoral em equinos saudáveis residentes em área endêmica para *Leishmania infantum*. Quando realizado o teste de ELISA, para IgG, não encontraram animais positivos em um grupo de 112 animais. Entretanto, 55 amostras foram submetidas a teste para avaliar a proliferação de linfócitos e, destas, 20 foram positivas. Este dado suplementa a hipótese de que, a resposta humoral a *L. infantum* nos cavalos estudados foi fraca em comparação com a observada em cães (FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006).

A padronização da técnica de ELISA permitiu a avaliação de amostras sorológicas nas espécies canina e equina e, complementando trabalhos realizados com reação em cadeia da polimerase (PCR) (ESCOBAR et al., 2020; ESCOBAR et al., 2019; PRADELLA et al., 2020), elucidou a presença de animais sororeagentes para *Leishmania infantum* nas zonas urbana e rural dos municípios de Uruguaiana e Barra do Quaraí/RS. Estes dados demonstram que a doença está ocorrendo na região e, existe a necessidade de investigação de possíveis reservatórios.

6. CONCLUSÃO

O trabalho permitiu o desenvolvimento e padronização da técnica de ELISA indireto para detecção de resposta imune (IgG) anti-*Leishmania infantum* nas espécies canina e equina. A fixação das placas com antígeno cru proveniente de cultivo de *Leishmania infantum*, possibilitou a realização dos testes de forma menos dispendiosa, quando comparada ao desenvolvimento de proteínas recombinantes.

A padronização para a espécie canina foi realizada mais rapidamente, quando comparada aos equinos, pois havia disponibilidade de teste imunocromatográfico (DPP®-Biomanguinho) para triagem e definição dos controles. As condições ideais definidas foram: 10ug/ml de *L. infantum* para fixação das placas, diluição do anticorpo primário 1/800 e anticorpo secundário 1/10000. Com isso, foram testadas 51 amostras caninas onde, foram obtidos 17 animais positivos e, destes, 16 foram positivos no teste imunocromatográfico.

Com relação aos equinos, não havendo teste rápido disponível, foi realizada a hiperimunização de um animal com antígeno inativado (*L. infantum*). Após a aplicação de quatro doses em intervalos de quinze dias, foi possível iniciar a padronização para a espécie. Sendo definida como ideal as mesmas condições usadas para cães, com exceção da diluição do anticorpo primário que foi de 1/200. Foram testados 159 equinos e, destes, 16 apresentaram sororeatividade.

O presente estudo permitiu o desenvolvimento do teste ELISA indireto e sua aplicação em amostras biológicas provenientes de animais residentes na fronteira Oeste do Rio Grande do Sul. A identificação de animais sororeagentes fortalece a importância da doença na região e elucidada a presença de um potencial reservatório, o equino.

Tendo em vista o papel, já bem definido, dos caninos no ciclo biológico da *Leishmania*, bem como, a identificação de equinos sororeagentes e sua possível participação na disseminação e manutenção das leishmanioses, a presença de animais infectados causa preocupação devido ao agravo, tanto a saúde humana quanto animal nessa região do Brasil.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, Cruz Manuel; RANGEL, Elizabeth Ferreira; DEANE, Leonidas M. Cutaneous leishmaniasis is frequent in equines from an endemic area in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 4, p. 471-472, 1986
- AISA, M. Jesus et al. Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 2, p. 154–159, 1998.
- ALEMAN, Cesar. Finestructure of cultured *Leishmania brasiliensis*. **Experimental Parasitology**, v. 24, n. 2, p. 259–264, 1969.
- BANETH, Gad et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–330, 2008.
- BARATA, Ricardo Andrade et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 421–425, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v38n5/a12v38n5.pdf>>.
- BASURCO, Asier et al. Evaluation of the performance of three serological tests for diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs using latent class analysis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 29, n. 4, p. 1–10, 2020.
- BENASSI, Julia Cristina et al. Molecular and serological detection of *Leishmania spp.* in horses from an endemic area for canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 6, p. 1058–1063, 2018.
- BRAVO, Andrea Gómez et al. The first record of *Lutzomyia longipalpis* in the Argentine northwest. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 1071–1073, 2013.
- BRAY, R. S. & LAINSON, R. The immunology and serology of Leishmaniasis i. The fluorescent antibody staining technique. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 5, p. 535–544, 1965.
- BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 392, p.

951–970, 2018.

CAVALIERO, Tanja et al. Clinical, Serologic, and Parasitologic Follow-Up after Long-Term Allopurinol Therapy of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 9, p. 330–334, 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. **Parasites - Leishmaniasis**. CDC, p. 1, 2020. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>>.

CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE [CEVS]. **Situação Epidemiológica da Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul**. Governo do estado do Rio Grande do Sul/Secretaria de saúde, p. 1–4, 2017.

CHAGAS, Erica Cristina Da Silva et al. Composition of sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) and detection of *Leishmania* DNA (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in different ecotopes from a rural settlement in the central Amazon, Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.

CHRISTOPHERSON, J. B. The “Blue Bodies” in Leishmaniasis. **Section of Tropical Diseases and Parasitology**, p. 21–23, 1922.

COOK, G. C. William Twining (1790–1835): The first accurate clinical descriptions of “tropical sprue” and kala-azar? **Journal of Medical Biography**, v. 9, n. 3, p. 125–131, 2001.

COTA, Gláucia Fernandes et al. Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: A cross-sectional delayed-type study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 3, p. 570–577, 2013.

DA SILVA, Kleverton Ribeiro et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 1, p. 53–62, 2017.

DANTAS-TORRES, Filipe. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3–4, p. 139–146, 2007.

DE SOUSA, Marcus Vinícius Caetano et al. Sensitivity of parasitological test in spleen, bone marrow and lymph node imprints for leishmaniasis diagnosis according to the number of evaluators. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 39, n. 3, p. 176–181, 2017.

- DE SOUZA, Nataly A.; BRAZIL, Reginaldo P.; ARAKI, Alejandra S. The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 161–174, 2017.
- DEPLAZES, Peter et al. Specific IgC1 and IgC2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite immunology**, v. 17, p. 451–458, 1995.
- DO ROSÁRIO, Eliza Yoshie et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 197–203, 2005.
- DOS SANTOS, Soraya Oliveira et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 3, p. 315–317, 1998.
- DUPREY, Zandra H. et al. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000–2003. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 440–446, 2006.
- ESCOBAR, Taiane Acunha et al. Applications of polymerase chain reaction for the detection of equine *Leishmania sp.* Infection. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 1, p. 199–211, 2020.
- ESCOBAR, Taiane Acunha et al. Assessment of *Leishmania infantum* infection in equine populations in a canine visceral leishmaniosis transmission area. **BMC veterinary research**, v. 15, n. 1, p. 381, 2019.
- ESCOBAR, Taiane Acunha et al. Molecular detection of *Leishmania spp.* in Brazilian cross-border south region mammalian hosts. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 2, p. 476–480, 2020.
- ESCOBAR, Taiane Acunha et al. Risk factors associated to canine visceral leishmaniasis in uruguaiana city, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 1, p. 211–220, 2018.
- EVERS, Fernanda et al. Presence of anti-*Leishmania spp.* antibodies in slaughter horses in Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 6, p. 3921–3926, 2017.
- FARIA, Angélica Rosa et al. Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum*-Infected Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. 13–16, 2015.
- FEITOSA, Francisco Leydson Formiga et al. Estudo soropidemiológico de leishmaniose em equinos na região de Araçatuba-SP, Brasil, área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian**

Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 49, n. 6, p. 500–502, 2012. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84876472179&partnerID=40&md5=d2e6f306febd3ad6dab48ff55b179f7d>>.

FERNÁNDEZ-BELLON, Hugo et al. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 181–185, 2006.

FERREIRA, Paulo R.B. et al. Teste de elisa indireto para diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral em cães silvestres. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 528–534, 2013.

FIGUEIREDO, Fabiano Borges 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, 2018.

FOGLIA MANZILLO, Valentina et al. Prospective Study on the Incidence and Progression of Clinical Signs in Naïve Dogs Naturally Infected by *Leishmania infantum*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2013.

FONSECA, T. H. S. et al. Chemiluminescent ELISA with multi-epitope proteins to improve the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **The Veterinary Journal**, v. 253, p. 105387, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.105387>>.

FUKUTANI, Kiyoshi F. et al. Serological survey of *Leishmania* infection in blood donors in Salvador, northeastern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2014.

GAZZONIS, Alessia Libera et al. Detecting antibodies to *Leishmania infantum* in horses from areas with different epizooticity levels of canine leishmaniosis and a retrospective revision of Italian data. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04385-8>>.

GRILL, Fabio & ZURMENDI, Marcela. Leishmaniasis visceral en Uruguay [Visceral leishmaniasis in Uruguay]. **Archivos de Pediatría del Uruguay**, v. 88, n. 1, p. 32–38, 2017.

HOMMEL, M. et al. The micro-elisa technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 72, n. 3, p. 213–218, 1978.

INIESTA, Laura et al. Diagnostic Techniques To Detect Cryptic Leishmaniasis in Dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 1137–1141, 2002.

KEVRIC, Ines; CAPPEL, Mark A.; KEELING, James H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2015.03.018>>.

KOEHLER, Kernt et al. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 1–2, p. 9–17, 2002.

KOUAM, Marc K. et al. A seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Echinococcus* and *Trichinella* in equids in Greece and analysis of risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1–2, p. 170–175, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.004>>.

KRAUSPENHAR, Cristina et al. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 907–910, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782007000300052&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

LACHAUD, Laurence et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210–215, 2002.

LEISHMAN, William Boog. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **British Medical Journal**, v. 1, n. 2213, p. 1252–1254, 1903.

LEISHMAN, William Boog. Critical review: Kala azar and tropical sore. **Quarterly Journal of Medicine**, v. os5, n. 1, p. 109–152, 1911.

LEQUIN, Rudolf M. Enzyme Immunoassay (EIA)/ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 2415–2418, 2005.

LIMEIRA, Clécio Henrique et al. Clinical aspects and diagnosis of leishmaniasis in equids: A systematic review and meta-analysis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 4, p. 574–581, 2019.

LOPES, Ana Patrícia et al. Prevalence of antibodies to *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii* in horses from the north of Portugal. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, p. 9–12, 2013.

MADEIRA, Maria de Fátima et al. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 366–370, 2006.

MAHMOOD, Tahrin; YANG, Ping Chang. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 9, p. 429–434, 2012.

MAHMUD, Ibrahim Clós et al. Epidemiological aspects of the first human autochthonous visceral leishmaniosis cases in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 124–129, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2019.04.004>>.

MAIA-ELKHOURY, Ana N.S. et al. SisLeish: A multi-country standardized information system to monitor the status of Leishmaniasis in the Americas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1–14, 2017.

MANCIANTI, Francesca et al. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 59, n. 1, p. 13–21, 1995.

MANCIANTI, Francesca; PEDONESE, Francesca; POLI, Alessandro. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Veterinary Parasitology**, v. 65, n. 1–2, p. 1–9, 1996.

MARTIN, S. K. et al. A diagnostic ELISA for visceral leishmaniasis, based on antigen from media conditioned by *Leishmania donovani* promastigotes. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 92, n. 5, p. 571–577, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE [MS]; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ [FIOCRUZ]. **Treinamento LPL/LRNTL/CLIOC**. Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE [MS]. **Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. Nota técnica conjunta nº 01/2011. Disponível em: <http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/nota-tecnica-no.-1-2011_cglab_cgdt1_lvc.pdf>. , 2011

NETO, Rafael Gonçalves Teixeira et al. Relationship of *Leishmania*-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 248-257, 2010.

OLIVEIRA, Patrícia Magalhães et al. Seroepidemiology of *Leishmania spp.* in equids from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, n. 5, p. 3–6, 2017. Disponível em: <

84782017000500501&lng=en&tlng=en>.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE [OPAS]; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [OMS]. **Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas**. Informe de Leishmanioses N° 7, v. 7, p. 1–8, 2019.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION [PAHO]; WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO]. **Leishmaniasis - Epidemiological Report of the Americas - N°8**, v. 8, p. 1–10, 2019.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION [PAHO]. **Leishmaniasis**. 2018. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>>.

PEIXOTO, Henry Maia; DE OLIVEIRA, Maria Regina Fernandes; ROMERO, Gustavo Adolfo Sierra. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 20, n. 3, p. 334–352, 2015.

PESSOA-E-SILVA, Rômulo et al. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. **Experimental Parasitology**, v. 199, p. 9–16, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.02.012>>.

PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**. Academic press: London, v. 1, 4. ed., p 1-120, 1987.

POCAI, Emersson et al. Visceral Leishmaniasis, cinco casos caninos em Santa Maria, RS. **Ciência Rural**, v. 28, n. 3, p. 501-505, 1998.

PRADELLA, Gabriela Döwich et al. Identification of *Leishmania spp.* in horses and a dog from rural areas of Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 6, p. 2687–2694, 2020.

RAJASEKARIAH, G. Halli R. et al. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. **Journal of Immunological Methods**, v. 252, n. 1–2, p. 105–119, 2001.

RODRÍGUEZ-ROJAS, Jorge J. et al. Ecology of phlebotomine sandflies and putative reservoir hosts of leishmaniasis in a border area in Northeastern Mexico: implications for the risk of transmission of *Leishmania mexicana* in Mexico and the USA . **Parasite**, v. 24, p. 33, 2017.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by leishman and donovan. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2237, p. 1261–1262, 1903.

SARIDOMICHELAKIS, Manolis N. et al. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 1, p. 82–86, 2005.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília-DF. Série A. Normas e Manuais Técnicos, 1 ed., p. 1-120, 2006.

SILVA, Denise Amaro Da et al. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Journal**, v. 195, n. 2, p. 252–253, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.06.010>>.

SOARES, Isabel Roussoulières. **Avaliação clínica e laboratorial de equinos sororreagentes para *Leishmania sp.* no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil**. Escola de Veterinária- *UFMG*, p. 132, 2012.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 3, p. 320–323, 2003.

SOUZA, Getúlio Dornelles; DOS SANTOS, Edmilson; FILHO, José Dilermando Andrade. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1181–1182, 2009.

TRUPPEL, Jessé Henrique et al. Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas?. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–6, 2014.

VINCENT, H. M. William Boog Leishman: Parasitologist and politician. **Parasitology**, v. 144, n. 12, p. 1582–1589, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO]. **Leishmaniasis- Epidemiological situation**, 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>.

ANEXO A- Protocolo de aprovação da pesquisa pelo comitê de ética em uso animal



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)



Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55)3911-0200, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 022/2017

Título: Identificação e caracterização molecular de *Leishmania sp.* em animais domésticos.

Data da aprovação: 03/07/2017

Período de vigência do projeto: 03/07/2019

Pesquisadores(a): Irina Lubeck

Campus: Uruguiana

Telefone: (55) 99948-7512

E-mail: irinalubeck@unipampa.edu.br

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Caninos, Felinos e Equinos
Nº de animais	135, 135 e 192
Peso/Idade	10, 5 e 320 Kg / 2 a 15 anos
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Bairros da zona urbana e rural dos municípios de Uruguiana e Barra do Quaraí

Profª. Drª. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA



CERTIDÃO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 014/2020

Título: Identificação e caracterização de *Leishmania* sp. em animais domésticos (ano 3)

Data da aprovação: 01/07/2020

Período de vigência do projeto: 30/07/2021

Pesquisadores(a): Irina Lübeck

Campus: Uruguiana

Telefone: (55) 99948-7512

E-mail: irinalubeck@unipampa.edu.br

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa		
	Cães	Equinos	Gatos
Espécie/Linhagem/Raça	Cães	Equinos	Gatos
Nº de animais	45	02	57
Peso/Idade	1-40 kg 1-12 anos	350 kg 1-20 anos	1-10 kg 1-10 anos
Sexo	Machos e fêmeas	Machos e fêmeas	Machos e fêmeas
Origem	Domicílios e/ou propriedades dos municípios de abrangência do projeto	Fazenda escola/ UNIPAMPA - campus Uruguiana	Domicílios e/ou propriedades dos municípios de abrangência do projeto



Documento assinado eletronicamente por **CATIA AUNE VEIVERBERG, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 01/07/2020, às 10:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0317270 e o código CRC 1EDDD25C.