

LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: DETECÇÃO DE DNA EM SORO POR PCR EM TEMPO REAL

Fernanda Rolim¹

Flávio Luiz Nunes de Carvalho²

Grazielle Lima Bello²

Mirela Gehlen³

Maria Laura Halon⁴

Raquel Rocha Lemos⁵

Regina Bones Barcellos⁵

Maria Lucia Rossetti⁶

RESUMO

O diagnóstico de leishmaniose visceral canina (LVC) pelas técnicas imunológicas ainda não é satisfatório, uma vez que a detecção de anticorpos nem sempre corresponde a presença do parasita no animal. O objetivo deste trabalho foi detectar DNA de *Leishmania* em soro de caninos por PCR em tempo real e comparar os resultados com os obtidos pelos métodos imunológicos (DPP® e ELISA). O DNA foi extraído de soro de 60 caninos e analisado por PCR em tempo real utilizando como alvo a região do cinetoplasto. Na comparação dos resultados, o teste molecular mostrou uma sensibilidade e especificidade de 86,2% e 93,5%, respectivamente. É possível concluir que este método poderia auxiliar em um diagnóstico de LVC mais preciso, uma vez que confirma a presença do DNA de *Leishmania* nos cães infectados.

Palavras-chave: *Leishmania*, PCR em tempo-real, cinetoplasto, diagnóstico, leishmaniose canina.

ABSTRACT

The canine visceral leishmaniasis (CVL) diagnosis by immunological techniques is not satisfactory, since antibodies do not always correspond to the presence of the parasite in the animal. The objective of this study was to detect *Leishmania* DNA in serum from canines by real-time PCR and compare the results with those obtained by immunological methods (DPP® and ELISA). The DNA was extracted of serum from 60 canines and was analyzed using real-time PCR targeting the kinetoplast region. Comparing the results, the molecular test showed a sensitivity and specificity of 86.2% and 93.5%, respectively. It was concluded that this method could help to improve a more accurate diagnosis of CVL, once it confirms the presence of *Leishmania* DNA in infected dogs.

Keywords: *Leishmania*, real-time PCR, kinetoplast, diagnosis, canine leishmaniasis.

¹ Acadêmica do curso de Farmácia/ULBRA – Bolsista PROICT/FAPERGS

² Acadêmico do Programa de Pós-graduação de Biologia Molecular e Celular Aplicada a Saúde/ULBRA

³ Acadêmica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas/UFRGS

⁴ Acadêmica do curso de Biologia/ULBRA

⁵ Pesquisadora da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

⁶ Professora – Orientadora do Programa de Pós-Graduação de Biologia Molecular e Celular Aplicada a Saúde/ULBRA (mrossett@terra.com.br)

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença zoonótica, transmitida pela picada de um inseto vetor infectado com o parasita *Leishmania*. No Brasil, a principal espécie responsável pela transmissão é a *Lutzomyia longipalpis*, sendo comum, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais (OLIVEIRA et al., 2006). A Organização Mundial da Saúde (OMS) lista a leishmaniose como uma das doenças tropicais negligenciadas em expansão e não existem instrumentos adequados e disponíveis para o seu controle (WHO, 2010). De acordo com a OMS, ocorre, anualmente, 1,3 milhões de novos casos de leishmaniose no mundo, e o Brasil, junto com a Índia, Bangladesh, Sudão, Nepal e Etiópia são responsáveis por 90% dos casos (WHO, 2015). Na América Latina a *Leishmania infantum* (sinônimo de *L. chagasi*) é o agente causador da leishmaniose visceral (LV) (KUHL et al., 2011).

No Brasil, entre 2000 a 2013 ocorreram 48.358 casos de LV humana (BRASIL, 2014). Os cães domésticos, que são entre 20 a 30 milhões (BRASIL, 2014), têm papel fundamental na transmissão da doença, pois funcionam como reservatórios do parasita (CASTRO-JUNIOR et al., 2014). Cães infectados por *Leishmania* podem manifestar os sintomas da doença (Leishmaniose Visceral canina – LVC), outros podem permanecer assintomáticos (CIARAMELLA et al., 1997). Os assintomáticos são, também, fontes para os vetores que transmitirão os parasitas para o homem (MOHEBALI et al., 2005). A detecção precoce de cães infectados é fundamental para impedir a expansão da doença, e essencial para o controle da mesma. O monitoramento e o controle da LVC é a estratégia para minimizar a disseminação da doença (DE BRITO et al., 2014; CURI et al., 2014). No Brasil, a LV humana e canina são endêmicas desde 1980 e, na ausência de um tratamento adequado e eficaz, podem levar ao óbito (MARZOCHI et al., 2009; CARRANZA-TAMAYO et al., 2010; TONINI et al., 2012).

No ano de 2011, o Ministério da Saúde (MS) do Brasil, estabeleceu um protocolo de diagnóstico da LVC, baseado em métodos imunológicos, recomendando o teste rápido imunocromatográfico “Dual-Path Platform” (TR DPP®) para triagem, e o teste imunoenzimático (ELISA EIE®) como confirmatório (BRASIL, 2011). Esse novo protocolo foi estabelecido com o intuito de melhorar a precisão do diagnóstico sorológico (GRIMALDI et al., 2012; COURA-VITAL et al., 2014). Apesar da falta de um padrão ouro adequado para estudos de avaliação, análises realizadas mostraram que esses métodos possuem um sensibilidade e especificidade moderada (LAURENTI et al., 2014; PEIXOTO; DE OLIVEIRA; ROMERO, 2015).

O controle da LV passa pelo diagnóstico da LVC para a eliminação dos reservatórios. Apesar da variedade de métodos disponíveis tanto imunológicos como moleculares para a detecção da infecção canina, o diagnóstico de LVC ainda é insatisfatório (COTA et al., 2013; FARIA et al., 2015). Os métodos sorológicos que detectam anticorpos são os mais utilizados, porém a sua real contribuição na detecção da infecção, bem como sua acurácia e utilização em diferentes cenários carecem de estudos mais adequados (PEIXOTO; DE OLIVEIRA; ROMERO, 2015). A reação cruzada com outras doenças é responsável por resultados falsos positivos, assim como a baixa concentração de anticorpos em estágios

iniciais da doença pode significar resultados falsos negativos (FERREIRA et al., 2007; VIOL et al., 2012; PEIXOTO; DE OLIVEIRA; ROMERO, 2015).

O diagnóstico molecular para a detecção de gênero ou de espécie de *Leishmania* utilizando PCR convencional ou em tempo real tem sido descrito com resultados satisfatórios (TOZ et al., 2013; CECCARELLI et al., 2014). A sensibilidade e especificidade dos métodos moleculares descritos na literatura são variáveis e difíceis de comparar, uma vez que depende da amostra, dos *primers* e da técnica de extração utilizadas (DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015). Um estudo para avaliar a acurácia de um PCR em tempo real, para diagnosticar LVC, tendo como região alvo de amplificação o DNA do cinetoplasto, mostrou que, em cães, o método possuía maior sensibilidade quando comparado aos métodos sorológicos e parasitológicos, dada a sua capacidade de detecção do DNA, mesmo com baixa parasitemia (SOLCÀ et al., 2014).

Como a eutanásia é o destino dos cães soropositivos (BRASIL, 2011), um método altamente específico é necessário. Também, uma alta sensibilidade do teste é imprescindível para a detecção da infecção em caninos assintomáticos. Além disso, a facilidade na obtenção da amostra clínica, também é importante ser considerada, a fim de evitar métodos de coleta mais invasivos. Na falta de um método que reúna todas as condições exigidas, uma associação de métodos poderia ser uma forma racional de se obter um diagnóstico mais preciso.

Assim, considerando que a demora no diagnóstico da LVC propicia a disseminação do parasita, e que a falta de especificidade dos testes sorológicos podem determinar que cães sadios sejam sacrificados, este trabalho teve como objetivo detectar DNA de *Leishmania* em soro por PCR em tempo real e comparar os resultados com os obtidos por métodos imunológicos preconizados pelo Ministério da Saúde.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Para a padronização dos ensaios de PCR, foram utilizadas 60 amostras de sangue (soro) de caninos com resultado conhecido nos testes sorológicos para leishmaniose (29 positivas e 31 negativas), provenientes do Laboratório de Parasitologia, do Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (LACEN/RS), da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul (FEPPS/RS, Brasil), que é referência no Estado para este diagnóstico. Essas amostras eram provenientes de caninos suspeitos de LVC de centros de controles de zoonoses e vetores, canis municipais, clínicas e, ainda, laboratórios de todo o Estado. O diagnóstico de LVC foi definido conforme protocolo recomendado pelo MS (Brasil), de acordo com a nota técnica nº 01/2011- CGDT/CGLAB/DEVIT/SVS/MS) que determina o teste rápido (TR DPP® Leishmaniose Visceral) para triagem e ELISA para confirmação (BRASIL, 2011).

Este estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), no Campus de Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil. As

amostras foram separadas em alíquotas no LACEN e transportadas ao laboratório da ULBRA em recipiente refrigerado.

Aspectos Éticos

As amostras deste estudo foram provenientes da execução de um projeto, que teve como co-participante a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFCSA e para realização dos procedimentos com animais, sob o protocolo 118/13.

Técnicas Laboratoriais

Testes imunológicos

Para este trabalho, todas as amostras enviadas pelo LACEN, positivas e negativas, foram novamente analisadas para confirmação dos resultados pelos mesmos kits recomendados pelo Ministério da Saúde (TR DPP® e ELISA EIE®), produzidos pela FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. A execução de ambos os testes foi realizada conforme recomendações do fabricante.

Para todos os testes realizados neste trabalho, foi utilizado como controle, soro de animal com LVC, confirmado anteriormente por todas as técnicas utilizadas no estudo.

Extração da DNA

O isolamento de DNA foi realizado a partir de 200 µL de soro pelo kit comercial *Nucleid Acid and Protein Purification* (Macherey-Nagel, Alemanha), conforme recomendações do fabricante. O protocolo incluiu lise celular com proteinase K para liberação de DNA e resina de sílica para purificação deste. Os DNAs extraídos foram armazenados em freezer à -20°C até o momento de sua utilização.

Amplificação por PCR em tempo real

Foram utilizados os *primers* 13A (5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3') e 13B (5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3') conforme descrito por Rodgers, Popper e Wirth (1990). A amplificação teve como alvo uma região de 120 pares de bases dos minicírculos do gênero *Leishmania*. Essas sequências de DNA estão presentes em cópias múltiplas em uma região conservada dos minicírculos de DNA do cinetoplasto (kDNA).

A amplificação por PCR em tempo real foi realizada em um termociclador *StepOne™ Real Time PCR Systems* (AB Applied Biosystems) e os produtos amplificados foram detectados por meio do fluoróforo SYBR® Green. A reação foi padronizada em um volume final de 20 µL, contendo 15 µL de Fast SYBR® Green master mix (AB Applied Biosystems), 10 pmol de cada primer e 5 µL de DNA extraído de soro canino. As condições da amplificação foram: ativação da enzima a 95°C por 20 segundos, desnaturação a 95°C por 1 segundo e, por fim, anelamento e extensão a 61°C por 20 segundos.

Para a padronização da reação de PCR foi feita uma curva de dissociação para a análise da concentração ideal de *primers* a serem adicionados à reação e a análise de uma

curva padrão da diluição seriada de DNA de referência de *Leishmania*. Para cada corrida de amplificação foi utilizado um controle negativo de reação (mix de PCR contendo água ultrapura) e controle positivo que consistia em DNA purificado de *Leishmania*. Todas as amplificações foram realizadas em duplicatas.

Teste de inibição da PCR

Para verificar a presença de inibidores, todas as amostras que apresentaram resultados negativos no PCR foram misturadas com DNA humano para amplificação de região do gene de β -globina com *primers* (5'ACACAACCTGTGTTCACTAGC3') e (5'CAACTTCATCCACGTTACCC3') (SAIKI et al., 1985).

Análises Estatísticas

Para a avaliação do ensaio de PCR em tempo real em comparação com os métodos imunológicos (referência), foram realizados os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, utilizando as fórmulas dispostas por Ferreira e Ávila (2011). Todos os cálculos foram feitos utilizando o *software* SPSS v. 21 para Mac OS e Excel 2011 para Mac.

RESULTADOS

Padronização da reação de PCR por real time

Para a padronização da PCR em tempo real, os *primers* foram testados em diferentes concentrações (40, 20, 15 e 10 pmol) e a temperatura de anelamento (60°C e 61°C). O melhor rendimento de reação de amplificação foi obtido com 10 pmol de *primers*, com uma temperatura de anelamento de 61°C.

Análise das amostras por PCR em tempo real

Foram analisadas pelo ensaio padronizado de PCR em tempo real um total de 60 amostras com resultado prévio pelos métodos imunológicos de referência (Tabela 1). De um total de 29 amostras positivas em ambos os métodos de referência (DPP e ELISA), foi possível detectar amplificação de DNA de *Leishmania* em 25 (86,2%). Em quatro delas, não houve amplificação (13,8%). Das 31 amostras negativas pelos métodos de referência, 29 (93,5%) apresentaram resultado também negativo pelo PCR em tempo real, e duas amostras apresentaram resultado positivo para a amplificação (6,5%). Todas as amostras negativas pelo PCR em tempo real também tiveram resultado negativo para a presença de inibidores.

Tabela 1 – Resultado do PCR em tempo real para detecção de DNA de *Leishmania* em comparação aos métodos de referência imunológicos (DPP e ELISA) para amostras caninas de soro.

		DPP e ELISA (referência)		
		Positivo (%)	Negativo (%)	Total (%)
PCR em tempo real	Positivo (%)	25 (41,6)	2 (3,3)	27 (45)
	Negativo (%)	4 (6,6)	29 (48,3)	33 (55)
	Total (%)	29 (48,3)	31 (51,6)	60 (100)

Em uma análise comparativa, em que foi considerado o resultado dos testes imunológicos (DPP e ELISA) como referência, a sensibilidade e especificidade do PCR em tempo real foram de 86,2% e 93,5%, respectivamente. Os valores preditivos positivo e negativo foram de 92,5% e 88,5%, respectivamente. A concordância do PCR em tempo real com os testes imunológicos (DPP e ELISA) foi muito boa, com índice kappa de 0,8 ($p < 0,0001$).

DISCUSSÃO

Neste trabalho, a padronização de um método de PCR em tempo real para a detecção de DNA de *Leishmania* em soro de caninos foi realizada, a fim de buscar uma técnica mais acurada com menos resultados falsos (positivos ou negativos) e assim reduzir o número de eutanásia em cães saudáveis e prevenir a infecção humana pela detecção precoce de LVC. Nas análises realizadas, foi possível detectar DNA de *Leishmania* utilizando os *primers* direcionados ao cinetoplasto do parasita em 25 dos 30 soros dos animais considerados positivos e em dois dos animais com diagnóstico negativo nos testes imunológicos.

As limitações demonstradas pelas técnicas sorológicas têm levado os pesquisadores a explorarem a biologia molecular, como uma alternativa para um diagnóstico preciso de leishmaniose visceral. A PCR em tempo real tem sido amplamente utilizada para a otimização de diagnósticos, utilizando vários alvos e amostras (DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009; SILVA et al., 2013). As infecções caninas por *Leishmania* tem sido melhor detectadas por testes moleculares do que por testes sorológicos. As amostras biológicas que podem ser utilizadas são variadas, desde sangue, pele ou medula óssea entre outras (LOMBARDO et al., 2012; DE PAIVA-CAVALCANTI, 2015). Comparando os resultados com amostras de sangue periférico e aspirado de medula óssea de pacientes com LV, o PCR no sangue periférico foi de 98,5% de sensibilidade e de 95,7%, no aspirado de medula (ANTINORI et al., 2007). O sangue é considerado um tipo de amostra menos invasiva e com um bom desempenho (MANNA et al., 2004; MOHAMMADIHA et al., 2013a; DE RUITER et al., 2014).

Nesse trabalho, os resultados encontrados nas amostras de soro analisadas por PCR em tempo real, comparado com o DPP e ELISA, revelaram uma sensibilidade e especificidade de 86,2% e 93,5%, respectivamente. Esses valores estão dentro dos limites de sensibilidade (72,2% a 98,7%) e especificidade (78% a 96,4%) encontradas por outros

autores (MOHAMMADIHA et al., 2013a; MOHAMMADIHA et al., 2013b; PEREIRA et al., 2014; CASTRO-JUNIOR et al., 2014; CECCARELLI et al., 2014).

Dentre as 29 amostras que foram positivas para os testes DPP e ELISA, 25, confirmaram a presença do DNA da *Leishmania* através do PCR em tempo real. Em quatro amostras não houve amplificação de DNA, o que foi confirmado no teste de inibição. Assim, o resultado negativo era verdadeiro e não causado por algum inibidor da reação de PCR que muitas vezes permanece na amostra. Essa divergência nos resultados dos testes, pode ter sido devido à presença de anticorpos em caninos, porém sem a presença do parasita (CURI et al., 2014). O estudo de Peixoto, de Oliveira e Romero (2015), demonstrou que os testes de triagem e confirmatório, propostos pelo Ministério da Saúde do Brasil, têm precisão moderada, necessitando de uma revisão em sua qualidade para o diagnóstico para LVC. A sensibilidade e especificidade do teste de ELISA estão relacionadas com o antígeno utilizado e isso pode alterar os resultados dos diagnósticos (SRIVASTAVA et al., 2013).

Das 31 amostras que foram negativas para DPP e ELISA, 29 confirmaram também foram negativas no PCR em tempo real. Porém, em duas amostras com resultado negativo pelo DPP e ELISA foi verificada a DNA da *Leishmania*. A elevação na produção de anticorpos específicos no hospedeiro ou reservatório é observada ao longo da progressão clínica da doença (DEPLAZES et al., 1995; SILVA et al., 2014). Dessa maneira, a falta de detecção de anticorpos nessas amostras, poderia ser devido a uma infecção inicial. No PCR, mesmo com quantidades ínfimas de parasitas, há a possibilidade de amplificação de DNA. Segundo de Queiroz et al. (2010), a PCR em tempo real, é uma técnica que possibilita a detecção de parasita em qualquer fase clínica da infecção. Portanto, quando a avaliação clínica e os testes sorológicos apresentam resultados negativos, o PCR em tempo real poderia ser utilizado como uma alternativa (DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015).

Nesse trabalho, o nível de concordância encontrado entre o PCR e o padrão de referência (DPP/ELISA) foi considerado muito bom (Kappa= 0,8). Essa concordância foi semelhante ao encontrado em outros estudos quando compararam os diagnósticos imunológicos com o PCR em tempo real (NASEREDDIN et al., 2006; MOHAMMADIHA et al., 2013a). Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que a utilização de soro canino como amostra e à amplificação do gene do kDNA por PCR em tempo real pode ser uma ferramenta útil para detecção da *Leishmania*. A inclusão de uma metodologia molecular, como a descrita, poderia auxiliar no diagnóstico de LVC, contribuindo na prevenção, na diminuição da propagação da LVC e suas consequências.

CONCLUSÃO

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina ainda é um desafio. Este trabalho mostrou que o PCR em tempo real pode ser utilizado junto ao protocolo recomendado pelo Ministério da Saúde, que utiliza o DPP e o ELISA, para confirmação dos casos de LVC. O protocolo de PCR em tempo real padronizado neste estudo confirmou 86,2%

dos casos positivos detectados pelo protocolo referência, e confirmou também 93,5% dos casos negativos. A utilização de um teste molecular como confirmatório poderia auxiliar nas diretrizes de prevenção e controle da leishmaniose no país.

REFERÊNCIAS

ANTINORI, S. et al. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. **Clin Infect Dis**, v. 44, p.1602, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. **Nota Técnica conjunta nº 1/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS, 2011**. Brasília: DVDT, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: DVE, 2014.

CARRANZA-TAMAYO, C. O. et al. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, p. 396, 2010.

CASTRO-JÚNIOR, J. G. et al. Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais State, Brazil, based on immunochromatographic dual-path platform (DPP®) and PCR assays. **Rev Inst Med Trop**, v. 56, p. 225, 2014.

CECCARELLI, M. et al. Detection and characterization of *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. **PLoS One**, v. 9, p. e88845, 2014.

CIAMARELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet Rec**, v. 22, p. 539, 1997.

COTA, G. F. et al. 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**, v. 89, p. 570, 2013.

COURA-VITAL, W. et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PLoS One**, v. 9, p. e91009, 2014.

CURI, N. H. A. et al. Factors associated with the seroprevalence of leishmaniasis in dogs living around atlantic forest fragments. **Plos One**, v. 9, p. 1, 2014.

DE BRITO, V. N. et al. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in Jaciara, Mato Grosso, Brazil, 2003 to 2012. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 23, p. 63, 2014.

DE PAIVA CAVALCANTI, M. et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **Vet J**, v.182, p. 356, 2009.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell Biosci**, v. 17, p. 5, 2015.

DE QUEIROZ, N. M. et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with IFAT and ELISA-test. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, p. 32, 2010.

DE RUITER, C. M. et al. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. **J Clin Microbiol**, v. 52, p. 3147, 2014.

DEPLAZES, P. et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunol**, v. 7, p. 51, 1995.

FARIA, A. R. et al. Novel recombinant multi-epitope proteins for the diagnosis of asymptomatic leishmania infantum-infected dogs. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, p. e3429, 2015.

FERREIRA, E. C. et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Vet Parasitol**, v. 146, p. 245, 2007.

FERREIRA, Antônio Walter; AVILA, Sandra do Lago Moraes. **Diagnóstico Laboratorial (das principais doenças infecciosas e auto-imunes)**. 2. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2011.

GRIMALDI, J. R. G., et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 106, p. 54, 2012.

KUHLS, K. Comparative microsatellite typing of new world leishmania infantum reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, p. e1155, 2011.

LAURENTI, M. D. et al. Comparative evaluation of the DPP(®) CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v. 205, p. 444, 2014.

LOMBARDO, G. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Vet Parasitol**, v. 184, p. 10, 2012.

MANNA, L. et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v. 125, p. 251, 2004.

MARZOCHI, M. C. et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, p. 570, 2009.

MOHAMMADIHA, A. et al. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. **Exp Parasitol**, v. 133, p. 89, 2013a.

_____. Canine visceral leishmaniasis: a comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. **Vet Parasitol**, v. 192, p. 83, 2013b.

MOHEBALI, M. et al. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. **Vet Parasitol**, v. 129, p. 243, 2005.

NASEREDDIN, A. et al. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. **J Parasitol**, v. 92, p.178, 2006.

OLIVEIRA, A. G., et al. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 869, 2006.

PEIXOTO, H. M.; DE OLIVEIRA, M. R.; ROMERO, G. A. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Trop Med Int Health**, v. 20, p. 334, 2015.

PEREIRA, M. R. et al. Comparison between conventional and real-time PCR assays for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 639310, 2014.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp Parasitol**, v. 71, p. 267, 1990.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350, 1985.

SILVA, D. T. et al. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 23, p. 179, 2014.

SILVA, L. A. et al. Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania* infection in a visceral leishmaniasis-endemic area. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 55, p. 101, 2013.

SOLCÀ, M. D. A. S. et al. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **PLoS One**, v. 9, p. e103635, 2014.

SRIVASTAVA, P. et al. Molecular and serological markers of *Leishmania donovani* infection in healthy individuals from endemic areas of Bihar, India. **Trop Med Int Health**, v. 18, p. 548, 2013.

TONINI, M. A. et al. First description of autochthonous canine visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, p. 754, 2012.

TOZ, S. O. et al. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of Leishmania parasite from human and dog clinical samples in Turkey. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, p. e2205, 2013.

VIOL, M. A. et al. Detection of cross infections by Leishmania spp. and Trypanosoma spp. in dogs using indirect immunoenzyme assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Parasitol Res**, v. 111, p. 1607, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva: WHO, 2010.

_____. **Visceral leishmaniasis**: control strategies and epidemiological situation update in East Africa. Report of a WHO bi-regional consultation Addis Ababa. Ethiopia: WHO, 2015.