



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

KARINA PALHARES DA SILVA

**DETECÇÃO DE DNA DE *LEISHMANIA* sp. EM AMOSTRAS DE SANGUE,
MEDULA ÓSSEA E PELE DE CÃES PROVENIENTES DE ÁREA DE BAIXA
TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL**

Niterói, RJ

2021

KARINA PALHARES DA SILVA

**DETECÇÃO DE DNA DE *LEISHMANIA* sp. EM AMOSTRAS DE SANGUE,
MEDULA ÓSSEA E PELE DE CÃES PROVENIENTES DE ÁREA DE BAIXA
TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Parasitologia

Orientador: Prof. Dr^a. Adriana Pittella Sudré

Coorientador Prof. Dr^a. Fernanda Nunes Santos

Niterói, RJ

2021

S586d Silva, Karina Palhares da
Detecção de DNA de Leishmania sp. em amostras de sangue, medula óssea e pele de cães provenientes de área de baixa transmissão de leishmaniose visceral / Karina Palhares da Silva ; Adriana Pittella Sudré, orientadora ; Fernanda Nunes Santos, coorientadora. Niterói, 2021.
85 f. : il.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPGMPA.2021.m.16242174782>

1. Leishmaniose Visceral. 2. Zoonose. 3. Cão. 4. Diagnóstico molecular. 5. Produção intelectual. I. Sudré, Adriana Pittella, orientadora. II. Santos, Fernanda Nunes, coorientadora. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto Biomédico. IV. Título.

CDD -

KARINA PALHARES DA SILVA

**DETECÇÃO DE DNA DE *LEISHMANIA* sp. EM AMOSTRAS DE SANGUE,
MEDULA ÓSSEA E PELE DE CÃES PROVENIENTES DE ÁREA DE BAIXA
TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Parasitologia

Aprovada em: ____ de _____ de 20__.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Daniela Leles de Souza (UFF)

Prof. Dr^a. Beatriz Brener de Figueiredo (UFF)

Prof. Dr^a. Flávia Coelho Ribeiro Mendonça (Fiocruz)

Niterói, RJ

2021

AGRADECIMENTOS

À Deus, que está sempre comigo me dando forças e a Nossa Senhora, mãezinha que intercede e cuida de mim em todos os momentos.

Ao meu marido Lucas Brito, meu parceiro da vida e melhor amigo, com quem eu sempre pude contar, pelo incentivo, a paciência e a ajuda durante todo o decorrer da minha formação.

Aos meus pais Carlos Alberto Inácio e Sheila Palhares, a quem eu devo tudo que sou hoje, por fazerem de tudo por mim e me ensinarem o valor da educação.

As minhas irmãs Carol e Camyla Palhares por terem me acompanhado durante todo o decorrer do projeto, pelo apoio e por estarem sempre presentes e compreenderem os momentos de ausência.

A minha avó Maria da Glória Palhares, por toda a ajuda, o carinho e o amor que recebo dessa mulher incrível.

Aos meus filhos (de quatro patas), Nina, Vodka, Whisky e Lion por todo o amor puro, o carinho, a companhia e por me transformarem em uma pessoa melhor desde que entraram na minha vida.

As minhas orientadoras Prof^ª. Dra. Adriana Pittella Sudré e Prof^ª. Dra. Fernanda Nunes Santos, mulheres fortes e cientistas admiráveis, por aceitarem me orientar e por todo o carinho. Por toda a atenção, paciência e por não desistirem de mim.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas, à coordenação e aos professores, por contribuírem durante todo o decorrer do mestrado para o meu aprendizado e formação.

À toda a equipe do Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LaPClinVigiLeish) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas INI-FIOCRUZ, especialmente a Dra. Aline Fagundes por me receber e por todo auxílio e suporte para a

realização do estudo. E a Yasmin Santos, uma amiga para a vida que ganhei durante o mestrado, por toda a ajuda, orientação e conselhos em todos os momentos.

À toda a minha turma de mestrado, toda formada por mulheres incríveis, lindas e fortes, em especial minhas amigas Marrara Sampaio, Aína Ramirez e Simone Brito, que mostram a sociedade o poder da mulher, pois lugar de mulher é onde ela quiser, no nosso caso na ciência.

Aos órgãos de fomento Proppi UFF pelo apoio e investimento e a CAPES, pela concessão da bolsa que foi essencial para me manter durante o mestrado.

À todos, meus sinceros agradecimentos.

“A compaixão para com os animais é das
mais nobres virtudes da natureza humana.”

Charles Darwin

RESUMO

O diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina recomendado pelo Ministério da Saúde é realizado utilizando-se dois testes imunológicos de referência, o TR-DPP® e o ELISA. Entretanto, estudos sugerem que os métodos sorológicos podem apresentar baixa sensibilidade em amostras de cães provenientes de áreas de baixa transmissão. Dessa forma, os métodos moleculares podem ser usados de forma complementar, pois detectam o DNA do parasito em diferentes tipos de tecidos através da amplificação de fragmentos genéticos do mesmo. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de detecção do DNA de *Leishmania* sp. em amostras de tecidos de 12 cães provenientes de área de baixa transmissão, previamente analisados em ensaios imunológicos de referência (TR-DPP® e ELISA) e parasitológicos (cultura *in vitro* de pele e medula). Foi realizada a PCR convencional utilizando os alvos moleculares kDNA e HSP70. A PCR com o alvo kDNA foi realizada em 14 amostras de isolados de *L. (L.) infantum* provenientes de cultivo *in vitro* (C), 12 amostras de fragmentos de pele (FP), 11 amostras de medula óssea (MO) e 12 amostras de sangue (S). A PCR com o alvo HSP70 foi realizado nas 14 amostras de C e 12 amostras de FP. Os resultados demonstraram que todas as amostras de C, FP e MO (100%) apresentaram amplificação próximo ao tamanho esperado de 120pb para o alvo kDNA, exceto S, com amplificação de apenas 1 (8,3%) amostra. Por outro lado, a PCR para o alvo HSP70 amplificou fragmentos de DNA próximo ao tamanho esperado de 234pb nas 14 (100%) amostras de C e em apenas 3 (25%) FP. Em comparação com os ensaios imunológicos, 91,6% (11/12) dos cães foram considerados positivos segundo o critério do Ministério da Saúde. O animal considerado negativo por esse critério apresentou amplificação para o alvo kDNA tanto na amostra de pele quanto no aspirado de medula. Além disso, foi possível observar amplificação de DNA de *Leishmania* sp. na altura esperada para o alvo kDNA em todos os animais estudados, independente da sintomatologia clínica. A detecção de DNA nas amostras de pele e medula óssea de cães foi superior comparado ao sangue para o alvo molecular kDNA. Em razão da observação de resultados semelhantes, o tecido da pele pode ser utilizado em substituição aos aspirados de medula óssea no diagnóstico da LVC, por caracterizar-se como um tecido de fácil obtenção e coleta pouco invasiva no animal. Cabe ressaltar que, apesar do isolamento prévio de *Leishmania (L.) infantum* em cultura de tecido em todos os animais, seguida de caracterização por isoenzimas, não foi possível a realização do sequenciamento nucleotídico para a confirmação da espécie das amostras amplificadas na PCR, representando, portanto, uma limitação do presente estudo.

Palavras Chaves: Leishmaniose Visceral, Zoonose, Cão, Diagnóstico molecular

ABSTRACT

The diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis recommended by the Health Ministry is the use of two reference immunological tests, TR-DPP® and ELISA. However, studies suggest that serological methods may have low sensitivity in samples from dogs from low transmission areas. Thus, molecular methods can be used in a complementary way since they detect the DNA of the parasite in different types of tissues through the amplification of genetic fragments of the parasite. This study aimed to evaluate the detection capacity of *Leishmania*'s DNA in tissue samples from 12 dogs from low transmission areas, previously analyzed by reference immunological (TR-DPP® and ELISA) and parasitological (in vitro culture of skin and bone marrow) assays. Conventional PCR was performed using the kDNA and HSP70 molecular targets. PCR with the kDNA target was performed on 14 samples of *L. infantum* (L.) isolates from in vitro culture (C), 12 samples of skin fragments (FP), 11 samples of bone marrow (MO) and 12 blood samples (S). PCR with the HSP70 target was performed on 14 C samples and 12 FP samples. The results showed that all samples of C, FP and MO (100%) presented amplification similar to the expected size of 120bp for the kDNA target, except for S, with amplification of only one (8.3%) sample. On the other hand, PCR for the HSP70 target amplified DNA fragments similar to the expected size of 234bp in 14 (100%) C samples and in only 3 (25%) FP samples. Compared with the immunological assays, 91.6% (11/12) of the dogs were considered positive according to Health Ministry criteria. The animal considered negative by this criterion showed amplification for the kDNA target in both skin sample and bone marrow aspirate. Thus, molecular methodology was more effective for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in the tissue samples studied, regardless of the symptomatology of the animal. DNA detection in dog skin and bone marrow samples was superior compared to blood for the kDNA molecular target. Due to the observation of similar results, skin tissue could be used to replace bone marrow aspirates in the diagnosis of CVL, as it is characterized as an easily obtainable tissue that requires less invasive collection in the animal. It is noteworthy that, although *Leishmania (L.) infantum* was previously isolated in tissue culture followed by isoenzyme characterization in all animals, it was not possible to confirm the species by means of nucleotide sequencing of the samples amplified in the PCR, therefore representing a limitation of the present study.

Keywords: Visceral Leishmaniasis; Zoonosis, Dog; Molecular diagnosis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Taxonomia do gênero *Leishmania*. Modificado de PAHO, 2019. 16
- Figura 2:** Formas evolutivas do protozoário *Leishmania (L.) infantum* visualizadas em microscopia óptica. Figura A: Formas amastigotas de *Leishmania* sp. em amostra de raspagem de tecido corado com Giemsa. B: Formas promastigotas de *Leishmania* em cultura “*in vitro*”. Modificado de CDC (acesso em 05/07/2021). Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. 18
- Figura 3:** Flebotomíneo, vetor do protozoário *Leishmania (L.) infantum*. 1. Esquematização do flebotomo macho e fêmea. Modificado de ALEXANDER B. Disponível em: <https://roddillon.com/dillons-sand-fly-research>. 2. Flebotomíneo durante o pouso, modificado de FIOCRUZ Amazônia. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/estudo-aponta-novo-vetor-para-leishmaniose-visceral>. 20
- Figura 4:** Ciclo biológico de flebotomíneos. Representação de todas as formas evolutivas; o ovo, a primeira fase larval (L1), a segunda fase larval (L2), a terceira fase larval (L3), a quarta fase larval (L4), a pupa e o adulto. Modificado de DILON R, 2008. Disponível em: http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle__habitats.htm. 21
- Figura 5:** Ciclo de vida do protozoário *Leishmania Leishmania infantum* nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. Modificado de CDC, 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. 25
- Figura 6:** Organização estrutural dos minicírculos do DNA do cinetoplasto. As setas indicam a região variável e a região conservada (fragmento de 120pb) (KOCHER et al., 2018). 34
- Figura 7:** Tamanho e posição dos fragmentos amplificados do gene da Proteína do Choque Térmico 70 kDa no cromossomo 28 de *Leishmania major*, utilizando diferentes pares de iniciadores através da PCR. HSP70A: 230 pb; HSP70B: 384 pb; HSP70C: 234 pb; HSP70D: 379 pb. Fonte: GRAÇA et al., 2012. 35
- Figura 8:** Regiões da população canina estudada. Os municípios de Niterói e Maricá, localizados na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. Modificado de SPINELLI (2018). 40
- Figura 9:** Desenho experimental dos métodos empregados em amostras de isolados de cultura. 44
- Figura 10:** Amplificações de amostras de isolados de cultura de *L. (L.) infantum* para o alvo kDNA. Revelação em gel de agarose a 2% e coradas por gel red utilizando marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb). Poço 1= PM: peso molecular (Ladder 100 PB – Ludwig Biotec); Poço 2 = C (-): controle negativo extração; Poço 3 a 10 = amostras de *L. (L.) infantum* (de 10 a 17); Poços 11 a 14: DNA de cepas controle: *Trypanosoma caninum*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) infantum* e *L.(V.) brasiliensis*; Poço 15 = controle negativo reação; Poço 16 = PM. 49
- Figura 11:** Amplificações de amostras de isolados de cultura de *L. (L.) infantum* para o alvo HSP70. Eletroforese em gel de agarose a 2% corada por gel red, utilizando marcador de peso

molecular de 100 pares de base (pb). Poço 1= PM: peso molecular (Ladder 100 PB – Ludwig Biotec); Poço 2 = C (-): controle negativo extração; Poço 3 a 15 = amostras de *L. (L.) infantum* (de 2 a 14); Poços 16-18 = DNA de cepas controle: *Trypanosoma caninum*; *L. (L.) infantum* e *L.(V.)brasiliensis*; Poço 19 = controle reação PCR (H₂O ultrapura); Poço 20 = PM.
50

Figura 12: Amplificações de amostras de sangue para o alvo PC03/PC04 para teste de inibição. Eletroforese em gel de agarose a 2% corada por solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL, utilizando marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb). Poço 1 a 12 = amostras de sangue; Poço 13 = C (+): controle positivo; Poço 14 = C (-): controle negativo; Poço 16 = PM: peso molecular.
52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Descrição das amostras de tecidos e isolados de *L. (L.) infantum* em cultura *in vitro* provenientes de cães de área de baixa transmissão nos municípios de Niterói e Maricá utilizados no presente estudo. 40
- Tabela 2:** Resultados da PCR para amplificação do alvo kDNA nas amostras de fragmentos de pele, aspirados de medula óssea e sangue proveniente de cães com leishmaniose visceral. 50
- Tabela 3:** Relação dos resultados moleculares e sorológicos de acordo com o critério diagnóstico atual do MS (TRDPP e ELISA). 52
- Tabela 4:** Relação dos resultados moleculares e sorológicos de acordo com o critério diagnóstico antigo para LVC do MS (ELISA e RIFI). 52
- Tabela 5:** Resultados da PCR para o gene alvo kDNA em amostras de tecidos de cães e diagnóstico sorológico levando-se em consideração os critérios atual e antigo do MS para o diagnóstico de LVC. 53
- Tabela 6:** Relação entre amplificação de DNA na altura esperada de 120pb na PCR para o alvo kDNA e sinais clínicos apresentados pelos cães. 54
- Tabela 7:** Relação entre os resultados moleculares e os dados parasitológicos, sorológicos (considerando métodos de referência atual e antigo do Ministério da Saúde para diagnóstico de LVC) e clínicos dos cães estudados. 55

LISTA DE ABREVIATURAS

- % : Porcentagem
μL: Microlitro
μm: Micrômetro
°C: Grau Célsius
C: Isolados de *L. (L.) infantum* proveniente de Cultivo *in vitro*
CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*/ Centro de Controle e Prevenção de Doenças
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*/ Ensaio de imunoabsorção enzimática
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz
FP: Fragmentos de Pele
HSP70: Proteína de Choque Térmico de 70 kDa
INI: Instituto Nacional de Infectologia
KDNA: DNA de Kinetoplasto
LaPClinVigiLeish: Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses
LC: Leishmaniose Cutânea
LM: Leishmaniose Mucocutânea
LV: Leishmaniose Visceral
LVA: Leishmaniose Visceral Americana
LVC: Leishmaniose Visceral Canina
mL: Mililitros
MO: Medula Óssea
MS: Ministério da Saúde
NaCl: Cloreto de magnésio
NNN: Meio de cultura Nicolle, Novy e McNeal
PAHO: Organização Pan-Americana da Saúde
Pb: Pares de base
PCR: Polymerase Chain Reaction/ Reação em cadeia da polimerase
RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*/ Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
RIFI: Imunofluorescência Indireta
RPM: Rotações por minuto
S: Sangue
TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido
TR-DPP®: Teste Rápido *Dual Parth Platform*
U: Unidade
WHO: *World Health Organization*/ Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 LEISHMANIOSES	15
2.2 LEISHMANIOSE VISCERAL	16
2.3 AGENTE ETIOLÓGICO	18
2.4 VETOR	20
2.5 RESERVATÓRIOS	22
2.6 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	22
2.7 CICLO	24
2.8 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.....	25
2.9 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	28
2.9.1 DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO	29
2.9.2 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	31
2.9.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	33
2.10 PREVENÇÃO E CONTROLE.....	36
3. OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS E DA POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	40
4.2 ASPECTOS ÉTICOS	42
4.3 OTIMIZAÇÃO DAS TÉCNICAS MOLECULARES.....	42
4.3.1 CULTURA <i>IN VITRO</i> DAS AMOSTRAS E EXPANSÃO DE CÉLULAS	42
4.4 ANÁLISES MOLECULARES	43
4.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE ISOLADOS DE CULTURA	43
4.4.2 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE FRAGMENTOS DE PELE	45
4.4.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE ASPIRADOS DE MEDULA ÓSSEA	45
4.4.4 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE SANGUE	46
4.4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	46
4.5 ANÁLISES DOS RESULTADOS.....	48

5. RESULTADOS	49
5.1 PADRONIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS	49
5.2 AMOSTRAS DE FRAGMENTOS DE PELE ÍNTEGRA	50
5.3 AMOSTRAS DE ASPIRADOS DE MEDULA ÓSSEA	50
5.4 AMOSTRAS DE SANGUE	51
5.5 RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS MOLECULARES E SOROLÓGICOS	52
5.6 RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS MOLECULARES E PRESENÇA DE SINAIS CLÍNICOS CARACTERÍSTICOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	54
5.7 RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS MOLECULARES E OS DADOS PARASITOLÓGICOS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	55
5.8 RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS MOLECULARES E OS DADOS PARASITOLÓGICOS E SOROLÓGICOS	55
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÕES	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
9. ANEXOS	78
7.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	79

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença negligenciada, que acomete em torno de 300 mil pessoas por ano, gerando mais de 20 mil mortes ao redor do mundo (WHO, 2018). Atinge principalmente as populações mais pobres provenientes da África, Ásia e Américas. No Brasil, a doença é causada por protozoários da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* e possui como principal vetor biológico o flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Possui alta letalidade em humanos e no meio urbano o principal reservatório é o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) (BRASIL, 2014; PAHO, 2019).

No Brasil, a LV inicialmente ocorria em ambientes rurais, sendo notificada principalmente no Norte e Nordeste (LAISON & SHAW, 1992). Atualmente, a doença vem se disseminando para áreas urbanas e periurbanas (MARZOCHI, 2016). O estado do Rio de Janeiro notifica casos de LV desde o ano de 1977 (MARZOCHI et al., 2009). Os municípios de Niterói e Maricá, localizados na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro são considerados área de baixa transmissão de LV, no qual, já foram reportados casos de leishmaniose visceral canina (LVC) e um único caso de LV humana, mas ainda não há dados de confirmação da autoctonia deste caso (DE PAULA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2015; RIO DE JANEIRO, 2021). Os casos de LVC são reportados principalmente na região oceânica e próximo às encostas de morros, áreas que apresentam precárias condições sanitárias, o que facilita a reprodução do flebótomo (SPINELLI, 2018). A LVC tende a preceder casos de LV humana, devido à presença do vetor e reservatório na região. Dessa forma, as áreas consideradas de baixa transmissão são importantes sentinelas para prevenir a dispersão do protozoário na região e evitar a ocorrência de casos humanos (RODRIGUES et al., 2013; NITERÓI, 2015).

Logo, o diagnóstico laboratorial é uma ferramenta importante que deve compreender métodos precisos e eficazes, a fim de um diagnóstico fidedigno dos casos da doença canina (Lopes et. al., 2017). Para o diagnóstico da LVC, o Ministério da Saúde (MS) padronizou a utilização de dois métodos imunológicos de referência, o TR-DPP® para uma triagem e o ELISA para a confirmação dos casos (BRASIL, 2011). Entretanto, os testes moleculares representam uma metodologia mais sensível e específica para a identificação de reservatórios e apresentam alta capacidade de detecção do DNA do parasito independente do estágio da doença no animal (de CARVALHO et al., 2018).

Os testes moleculares amplificam fragmentos genéticos de diversas regiões do DNA do parasito, a partir de diferentes amostras de tecidos (BRITTO; PEREIRA, 2014). A PCR para amplificação de um fragmento de 120pb da região conservada do minicírculo do kDNA é o alvo molecular mais utilizado para identificação de espécies de *Leishmania* (ROGERS et al., 1990). Além desse, a amplificação de uma região conservada de 234bp do gene HSP70 é considerada uma ferramenta molecular específica para o diagnóstico de protozoários do gênero *Leishmania* (GRAÇA et al., 2012).

A capacidade de detecção e identificação de *Leishmania* sp. pela técnica de PCR está diretamente ligada ao tipo de amostra utilizada, pois os tecidos apresentam distribuição distinta de parasitos e isso ocorre principalmente devido a resposta imune local e a afinidade da cepa de *L. (L.) infantum* (MAIA; CAMPINO, 2008). Amostras de pele e medula óssea apresentam maior carga parasitária, comparadas a amostras de sangue periférico, pois os parasitos se depositam em órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear. A pele apresenta grande quantidade de parasitos e caracteriza-se por ser um tecido de fácil obtenção (FARIA; ANDRADE, 2012). Já amostras de aspirados de medula óssea, apesar de possuírem ótimo desempenho em relação à detecção de DNA do parasito, necessitam de técnica de coleta mais invasiva para obtenção (QUARESMA et al., 2009).

A padronização dos métodos diagnósticos para detecção de LVC tem sido realizada em áreas endêmicas. No entanto, estes, podem não ter a mesma eficácia em áreas de baixa transmissão, devido à baixa carga parasitária encontrada nos tecidos dos cães infectados e baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* em cães assintomáticos (de CARVALHO et al., 2018). Assim, o desenvolvimento de estudos que visam aprimorar o diagnóstico da LVC nestas áreas, especialmente para avaliar métodos diagnósticos mais eficazes, é importante para prevenir a dispersão do protozoário na região e evitar a ocorrência de casos humanos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) que possuem ampla distribuição nos continentes ao redor do mundo e acometem populações de diversos países. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2018, sugerem que em média, de 700.000 a 1 milhão de novos casos ocorrem anualmente e mais de 1 bilhão de indivíduos vivem em áreas endêmicas com risco de contrair a infecção. Em 2017 a maioria dos casos (94%) ocorreu em países da África, Ásia e América Latina. O Brasil é endêmico para todas as formas da doença: cutânea, mucosa e visceral (WHO, 2019; PAHO, 2019).

As espécies de *Leishmania* pertencem a ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae (Figura 1) (REY, 2010). Os tripanossomatídeos são organismos que possuem uma única mitocôndria com a presença de um cinetoplasto, região onde se encontra grande parte do DNA mitocondrial (kDNA) (MASLOV et al., 2020).

Esses protozoários são heteroxênicos e necessitam de hospedeiro vertebrado e invertebrado para seu desenvolvimento. São transmitidos por vetores hematófagos, os insetos flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (SHERLOCK, 2003). As espécies de *Leishmania* possuem dois estágios evolutivos, a forma amastigota no interior do macrófago no hospedeiro vertebrado (AEBISCHER, 1994; ASHFORD, 1998) e a forma promastigota no trato gastrointestinal do hospedeiro invertebrado (LUTZ & NEIVA, 1912).

Os organismos do gênero *Leishmania* possuem uma grande variabilidade genética, sendo agrupados em subgêneros que são divididos em complexos, onde se agrupam as espécies. Estes invadem células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) de diversos órgãos e são divididos em dois grupos de acordo com o seu tropismo, as Leishmanias dermatrópicas e as viscerotrópicas (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003; REY, 2010; MARZOCHI et al., 2016). O primeiro grupo provoca a Leishmaniose Cutânea (LC) e a Mucocutânea (LM), sendo formado pelas espécies pertencentes aos complexos *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* e *L. mexicana*. As Leishmanias viscerotrópicas, provocam a

Leishmaniose Visceral (LV) que é causada por espécies do complexo *L. donovani* (PAHO, 2019).

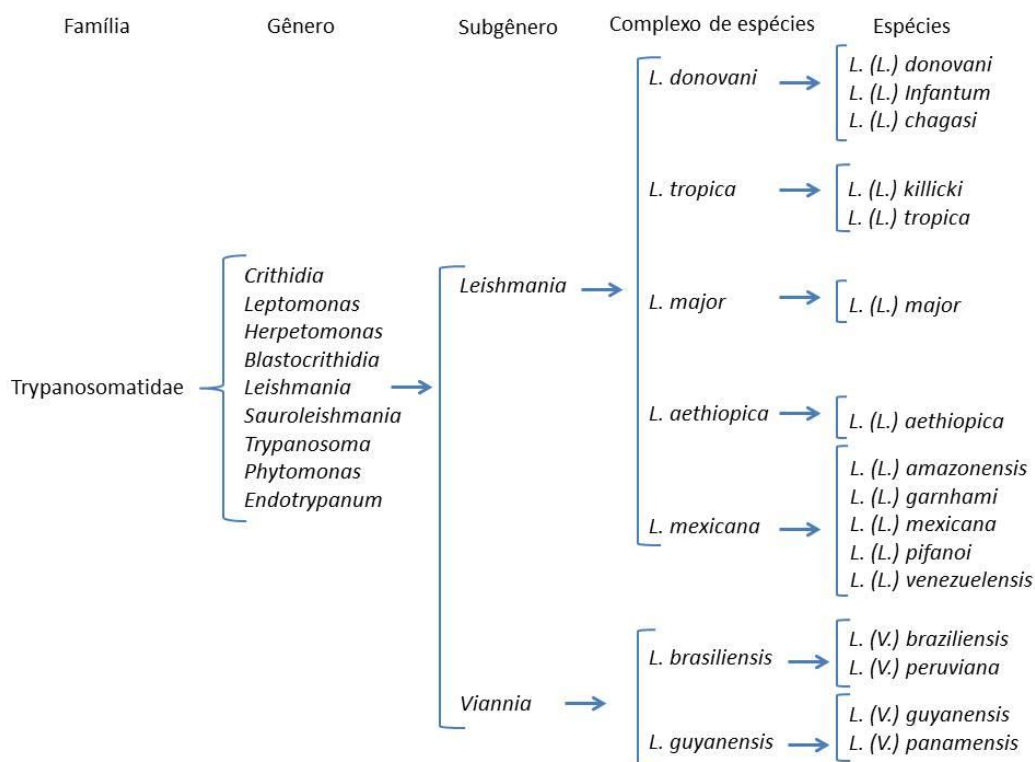


Figura 1 - Taxonomia do gênero *Leishmania*. Modificado de PAHO, 2019

No Brasil, as LC e LM são causadas principalmente pelo protozoário *L. (V.) braziliensis*. A LC é caracterizada por lesão ulcerada cutânea que geralmente aparece em áreas expostas do corpo como o rosto, os braços e as pernas. A LM é caracterizada por lesões localizadas na mucosa, como as narinas, o palato, e a gengiva. A LV é causada pelo protozoário *L. (L.) infantum* sendo caracterizada pela invasão de diversos órgãos e tecido hematopoiético. Os indivíduos infectados podem apresentar sinais e sintomas graves, como a hepatomegalia, esplenomegalia, perda de peso e evoluir a óbito (DAVID; CRAFT, 2009; BRASIL, 2014; PAHO, 2019).

2.2 LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral é uma zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania* e do complexo *Leishmania donovani*, e transmitida por vetores flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. No Velho Mundo, o agente etiológico da LV é a espécie *L.*

(*L. donovani*) e os vetores são os flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*. Nas Américas a doença é causada pelo protozoário *L. (L.) infantum*, o qual é transmitido por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

A doença ocorre desde 1835 na Grécia, onde ficou conhecida por causar a febre infantil e ganhou sinônimas como *hapoplínakon* e *ponos* (ALENCAR, 1977/78). Em 1869 novos casos ocorreram na Índia, onde a LV recebeu o nome de febre de Dum-Dum e kalazar indiano. Em 1903, William Leishman identificou corpúsculos ovais de 2-3 µm de diâmetro em fragmentos de baço obtidos de um soldado inglês que havia morrido de febre de Dum-Dum contraída na Índia. Durante o mesmo período, Charles Donovan observou células parasitárias em aspirados de baço de uma criança indiana que apresentava estado febril. No mesmo ano, Laveran e Mesnil descreveram o agente causador do calazar como *Piroplasma donovani*. Entretanto, foi Ross quem criou o gênero *Leishmania* e incluiu o protozoário, que teve a nomenclatura modificada para *Leishmania (L.) donovani* (NEVES, 2005; LAISON, 2010).

A primeira descrição de LV nas Américas ocorreu no Paraguai por Migone em 1913. Nesta ocasião, o paciente apresentava sintomas característicos de LV, além disso, foram observadas células semelhantes aos protozoários do gênero *Leishmania* no sangue do indivíduo. No Brasil, os primeiros casos da doença foram notificados apenas em 1934 por Penna, com o diagnóstico por exame direto de 41 casos através de amostras de fragmentos de fígado de pacientes, principalmente provenientes das regiões Norte e Nordeste (LAISON R. 2010).

De acordo com o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do MS, a LV ocorria inicialmente em ambientes rurais, sendo notificada principalmente no Norte e Nordeste. Nos últimos anos, a LV vem sofrendo uma rápida expansão geográfica devido às modificações no ambiente provocadas pela ocupação urbana não planejada, as precárias condições sanitárias e de habitação (WERNECK, 2010). Com isto, a doença que se propagou para os grandes centros urbanos, e atualmente, as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do país são as áreas mais afetadas pela LV (AZEVEDO et. al., 2019).

A forma visceral da leishmaniose é um grande problema de saúde coletiva, por ser uma doença grave, sistêmica e de evolução crônica. A maior parte dos casos é assintomática,

entretanto, na presença de sinais e sintomas, o indivíduo não tratado pode evoluir a óbito em 90% dos casos (BRASIL, 2010). As principais manifestações clínicas se caracterizam por febre intermitente, perda de peso, anemia, esplenomegalia e hepatomegalia (NEVES, 2005). Além disso, o tratamento medicamentoso da doença possui alta toxicidade e debilita o indivíduo com efeitos colaterais (DE MORAIS et al., 2015).

2.3 AGENTE ETIOLÓGICO

A espécie *Leishmania (L.) infantum* é o agente causador da Leishmaniose Visceral Americana (LVA), um parasito digenético, que mede em sua forma amastigota de 2 a 5 µm, e na forma promastigota entre 20 e 30 µm de comprimento (Figura 2) (PAHO, 2019). Foi descrito em 1907 por Nicolle, como causador do calazar indiano que acometia principalmente crianças. Entretanto, muitos pesquisadores relataram que o calazar não ocorria somente na Índia, acometia populações de outros países do Velho Mundo na Bacia do Mediterrâneo. Os primeiros casos da doença foram descritos na Tunísia em 1904, antes mesmo da descrição do agente etiológico. Segundo Killick-Kendrick (1985), a introdução da *L. (L.) infantum* nas Américas se deu através de colonizadores europeus.

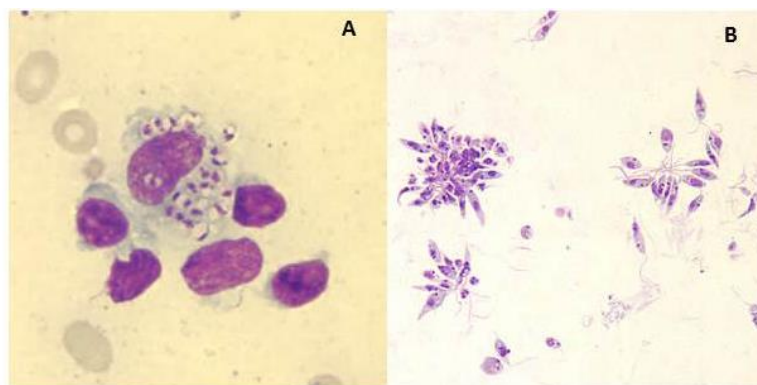


Figura 2 - Formas evolutivas do protozoário *Leishmania (L.) infantum* visualizadas em microscopia óptica. Figura A: Formas amastigotas de *Leishmania* sp. em amostra de raspagem de tecido corado com Giemsa. B: Formas promastigotas de *Leishmania* em cultura “in vitro”. Modificado de CDC (acesso em 05/07/2021). Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

No Brasil, os pesquisadores Cunha e Chagas desenvolveram diversas pesquisas, a fim de inocular o protozoário *L. infantum*. Para isto, os procedimentos foram realizados a partir de

tecidos de primatas não humanos e cães, conforme os protocolos executados no Velho Mundo. Após diversas tentativas sem sucesso, esses autores descreveram uma nova espécie como causadora da doença nas Américas, *Leishmania chagasi*. (LAISON, 2010; SILVEIRA, 2010, BENCHIMOL et al., 2019). A espécie foi intitulada em homenagem ao pesquisador Carlos Chagas (CUNHA & CHAGAS, 1937). A descrição da nova espécie foi sustentada por vários pesquisadores, até que em 1987, Laison e Shaw detectaram a infecção pelo protozoário causador da LV em raposas (*Cerdocyon thous*) assintomáticas. Esses autores determinaram que a ocorrência da doença de forma benigna, ou seja, sem a presença de sinais clínicos, classifica a raposa como um reservatório silvestre de *L. (L.) infantum* e para isto é necessária que tenha ocorrido uma interação ancestral parasito-hospedeiro. Desta forma, esta descoberta contradiz a teoria de Cunha e Chagas, de uma recente introdução da *L. (L.) chagasi* nas Américas como espécie causadora da LV (LAISON, 1987).

Nesse contexto, o avanço da tecnologia permitiu o desenvolvimento de novas metodologias diagnósticas, como os métodos moleculares que permitem o estudo do código genético do protozoário. Com isso, através de comparações genéticas entre as espécies *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* a partir de amostras de diversas origens geográficas, utilizando a técnica molecular de amplificação ao acaso de DNA polimórfico (RAPD), foi possível concluir que ambas as espécies possuem sequências de DNA idênticas, devendo portanto serem consideradas sinônimas (MAURICIO et al., 1999).

O protozoário é heteroxênico, sendo capaz de infectar hospedeiro vertebrado e invertebrado. Devido ao processo de metaciclologênese o parasito modifica sua forma, permitindo a infecção no hospedeiro vertebrado e a invasão de suas células. Dessa maneira, *L. (L.) infantum* apresenta duas formas evolutivas distintas. A forma amastigota, que invade as células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) de mamíferos e se reproduz por fissão binária. As amastigotas possuem formato arredondado e flagelo interiorizado. E a forma promastigota, que está presente no tubo digestivo do vetor flebotomíneo e se transforma em promastigota metacíclica a fim de se tornar infectante aos hospedeiros vertebrados. Os promastigotas possuem flagelos, estrutura que garante alta mobilidade celular e favorece sua aderência às células do hospedeiro (DE SOUZA, 2008; ROQUE et al., 2011).

2.4 VETOR

O principal vetor da LVA na América Latina é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* Lutz e Neiva (1912), pertencente a ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (SOARES & TURCO, 2003; DE SOUZA et al., 2017). Os flebotomíneos são pequenos, medindo de 1 a 3 mm de comprimento, apresentam coloração cor de palha a castanho-claro e são reconhecidos em diferentes regiões por nomes populares como mosquito palha e birigui (REY, 2010). Além disso, são caracterizados pela presença de pêlos densos na asa e no tórax e principalmente pela atitude durante o pouso, mantendo as asas arqueadas e entreabertas (Figura 3) (PAHO, 2019).

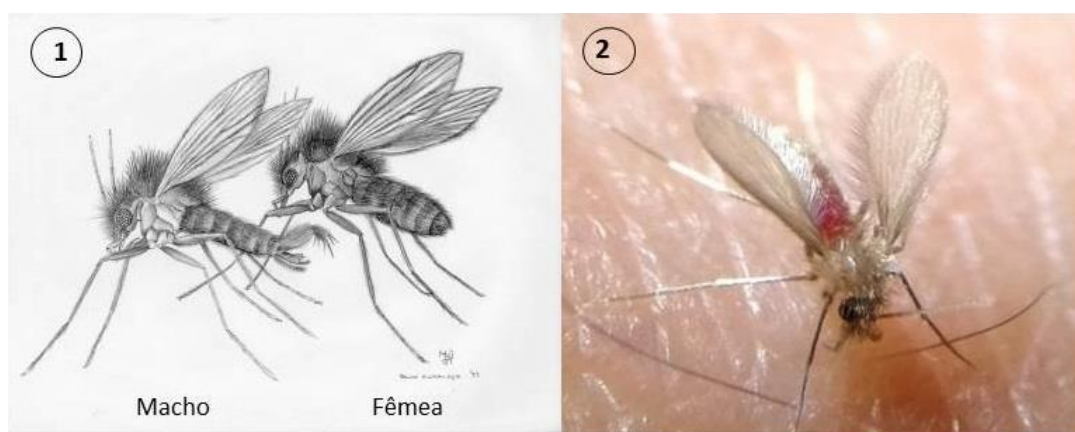


Figura 3 – Flebotomíneo, vetor do protozoário *Leishmania (L) infantum*. 1. Esquemática do flebotomo macho e fêmea. Modificado de ALEXANDER B. Disponível em: <https://roddillon.com/dillons-sand-fly-research>. 2. Flebotomíneo durante o pouso, modificado de FIOCRUZ Amazônia. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/estudo-aponta-novo-vetor-para-leishmaniose-visceral>

A família Psychodidae foi descrita por Newman em 1834, e posteriormente foi criado o gênero *Flebotomus* por Rondani e Berté (1840) que foi modificado para *Phlebotomus* Agassiz (1846). Lutz e Neiva em 1912 descreveram a espécie *P. longipalpis*. Em 1920, França criou o subgênero *Lutzia*, que posteriormente foi modificado para *Lutzomyia*, onde foi incluída a espécie *P. longipalpis*, alterada para *Lu. longipalpis* (GALATI, 2003; DE SOUZA et al., 2017).

A princípio a presença de *Lu. longipalpis* era notificada principalmente em áreas de mata participando do ciclo silvestre de transmissão e em ambientes rurais, localizados principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país (BRASIL, 2014). Entretanto, o flebótomo sofreu adaptações e atualmente possui uma ampla distribuição geográfica sendo encontrado em áreas periurbanas e urbanas (FUZARI et al., 2016). Nas últimas décadas, o inseto se propagou para os grandes centros urbanos, principalmente das regiões Sudeste e Centro-Oeste do país, invadindo as residências (ANDRADE-FILHO et al., 2017).

Os flebotomíneos são holometabólicos e passam por fases de desenvolvimento de ovos, larvas, pupas e adultos (AGUIAR & MEDEIROS, 2003). Após a cópula, a fêmea coloca seus ovos no solo úmido e rico em matéria orgânica e após cerca de dez dias os ovos eclodem e se transformam em larvas, passando por quatro estágios larvais durante um período de até 30 dias. Após o quarto estágio larval diferencia-se em pupas, durante aproximadamente duas semanas e posteriormente se tornam insetos adultos (Figura 4) (BRASIL, 2014). Os flebotomíneos apresentam dimorfismo sexual e machos e fêmeas se alimentam sugando a seiva das plantas a fim de obter carboidrato. No entanto, as fêmeas necessitam da alimentação sanguínea, em virtude da necessidade de adquirir mais nutrientes para a maturação de seus ovos (SHERLOCK, 2003). As fêmeas do flebótomo realizam o hábito de hematofagia em uma ampla gama de animais vertebrados, pois se alimentam do sangue de mamíferos, aves, répteis e anfíbios (MONTEIRO et al., 2005).

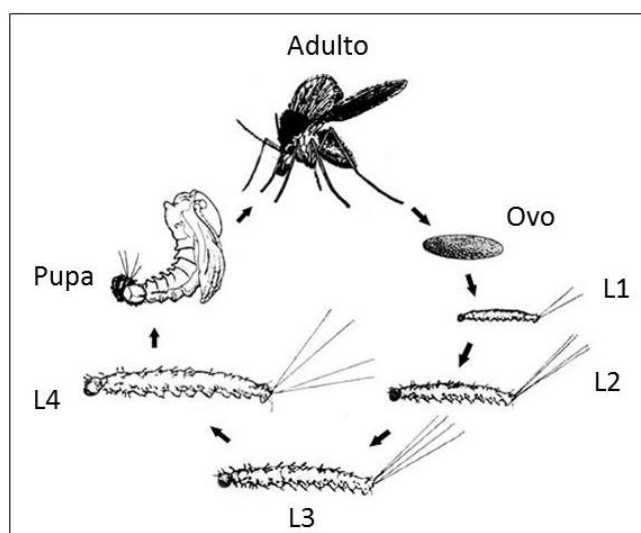


Figura 4 – Ciclo biológico de flebotomíneos. Representação de todas as formas evolutivas; o ovo, a primeira fase larval (L1), a segunda fase larval (L2), a terceira fase larval (L3), a quarta fase larval (L4), a pupa e o adulto. Modificado de DILON R, 2008. Disponível em: http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle__habitats.htm

Esses dípteros apresentam atividade noturna e crepuscular e se multiplicam mais abundantemente durante o período de alta pluviosidade (TEODORO et al., 1993). Como hospedeiros invertebrados, os flebótomos transmitem o parasito no ato da hematofagia. Quando realiza hematofagia em um hospedeiro vertebrado infectado, o flebotomíneo ingere células infectadas, mantendo o ciclo do protozoário no ambiente (DIAS et al., 2003).

2.5 RESERVATÓRIOS

A LV é uma zoonose cujo protozoário causador, *L. (L.) infantum*, infecta animais silvestres e domésticos (SHERLOCK et al., 1984). No ambiente silvestre os principais reservatórios são raposas (*Cerdocyon thous* e *Lycalopex vetulus*), marsupiais (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*) e roedores (*Rattus rattus* e *Proechimys* sp.) (LAISON et al., 1990; LAISON & SHAW, 1992).

O cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) é considerado o principal reservatório urbano do parasito (BRASIL, 2020). Mesmo com ausência de sinais e sintomas clínicos, os cães infectados podem apresentar abundante carga parasitária na pele, o que facilita a transmissão do parasito por intermédio da infecção do hospedeiro invertebrado (flebotomíneo), que se dá pela ingestão de formas amastigotas presentes no tecido. Com isto, devido à alta capacidade de infectar o vetor e a constante proximidade com o humano, o cão desempenha um papel muito importante no ciclo da LV (FERRER, 1988; LAISON et al., 1990; ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003).

2.6 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A LVC é prejudicial em uma perspectiva de saúde única, uma vez que a doença em cães precede a ocorrência da doença em humanos, portanto, a presença de cães infectados é considerada um fator de risco para a LV humana (BRASIL, 2014; WHO, 2015; Travi et al., 2018).

A evolução da infecção no cão e as características clínicas dependem da complexa interação entre parasito e hospedeiro, de forma que, a suscetibilidade do cão a LV varia de forma individual (DE MORAIS et al., 2015). Os cães infectados por *L. (L.) infantum* podem

ou não apresentar sinais clínicos, o que ocorre principalmente devido carga parasitária e cepa do parasito circulante, a resposta imune e a predisposição genética do hospedeiro (MICHALICK; 2005; GRIMA, 2005).

Uma imunidade protetora depende das respostas inata e adaptativa (DE MORAIS, 2015). As células do sistema imunológico inato são responsáveis pelo reconhecimento e pela fagocitose do protozoário, assim como pela expressão de moléculas que estimulam células apresentadoras de antígenos e influenciam na diferenciação de linfócitos (QUINNELL & COURTENAY, 2009). Durante a infecção, o parasito invade as células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) como os linfonodos, o baço, a medula óssea, a pele (REY, 2014). Por outro lado, no sangue, raramente são detectados parasitos de *L. (L.) infantum*, pois estes se depositam nos órgãos ricos em células do SFM (OLIVEIRA et al., 2015).

Na resposta imune adaptativa ocorre o aumento da produção e da diferenciação dos linfócitos T, estimulados pelas células do SFM, que podem apresentar perfis de citocinas Th1 e Th2 (COURA-VITAL, 2011). A resposta inflamatória da célula Th1 está associada a uma resposta protetora contra a LVC, pois é responsável pela secreção de citocinas interleucina – 2 (IL-2) e interferon - γ (IFN- γ), que ativam os macrófagos para a produção de óxido nítrico (ON) que possui ação leishmanicida, e promove a lise do parasito, levando a uma resposta protetora. As células Th2 produzem uma resposta anti-inflamatória, secretando IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 que são imunossupressoras e permitem a proliferação de amastigotas, estando associadas a doença (DE MORAIS et al., 2015).

Os sinais e sintomas da LVC estão associados à relação parasito hospedeiro, à carga parasitária e aos tipos de linfócitos produzidos (VALLADARES et al., 1998). O perfil de citocinas produzidas determina o curso da infecção, de maneira que os cães com resposta predominantemente Th1 tendem a ser assintomáticos e aqueles com Th2, sintomáticos. Os fatores relacionados à produção de citocinas estão ligados principalmente a variabilidade genética, a virulência da cepa inoculada e a carga parasitária (DUARTE et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2016).

A LVC é uma doença de evolução crônica, sistêmica e que pode ser fatal (PAHO, 2019). Os sinais clínicos mais comumente apresentados pelo cão variam entre linfadenopatia, onicogribose, sinais cutâneos e oculares, alopecia, perda de resistência, emagrecimento,

desidratação e esplenomegalia (BRASIL, 2020). Além destes, anemia é um sintoma comumente observado em cães infectados (SPINELLI et al., 2019).

Na infecção por *Leishmania (L.) infantum* é observada uma elevação dos níveis séricos de anticorpos, especialmente as imunoglobulinas da classe IgG, que ocorre devido à produção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães que apresentam resposta imune humoral exacerbada, o que contribui com o estabelecimento da doença e está relacionada ao aparecimento dos sintomas (COURTENAY et al., 2002).

2.7 CICLO

O ciclo da LV se inicia quando a fêmea do flebotomíneo infectada realiza o repasto sanguíneo em vertebrados e inocula formas promastigotas metacíclicas, a forma infectante ao hospedeiro vertebrado. Os promastigotas de *L. (L.) infantum* logo são fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), como os macrófagos e neutrófilos, e se diferenciam em amastigotas. Estas se multiplicam por fissão binária simples sucessivamente, até o ponto de rompimento da célula e a liberação de milhões de amastigotas no meio extracelular. Que por sua vez, migram por via hematogênica e invadem novas células de tecidos, como o baço, linfonodo, fígado e medula (REY, 2010; BRASIL, 2014).

No hospedeiro invertebrado, o ciclo se inicia quando a fêmea do flebotomíneo ingere macrófagos repletos de amastigotas ao realizar o repasto sanguíneo no vertebrado infectado. No tubo digestivo do vetor ocorre o rompimento dos macrófagos e os amastigotas se diferenciam em formas promastigotas, que se multiplicam por divisão binária. Por sua vez, as promastigotas migram para a porção anterior do tubo digestivo do vetor, e a abundante carga parasitária dificulta sua ingestão de sangue nos próximos repastos sanguíneos. Dessa maneira, o flebotomíneo necessita se alimentar mais vezes, o que pode aumentar a chance de infecção de um número maior de hospedeiros vertebrados (p.ex., o cão e o humano). Após colonizar a porção anterior do tubo digestivo do vetor, os promastigotas se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas e migram para a probóscide. Desta forma, quando o flebotomo infectado for realizar o próximo repasto sanguíneo o ciclo se reinicia, com a inoculação da forma infectante no hospedeiro vertebrado (Figura 5) (REY, 2010; COURA, 2013).

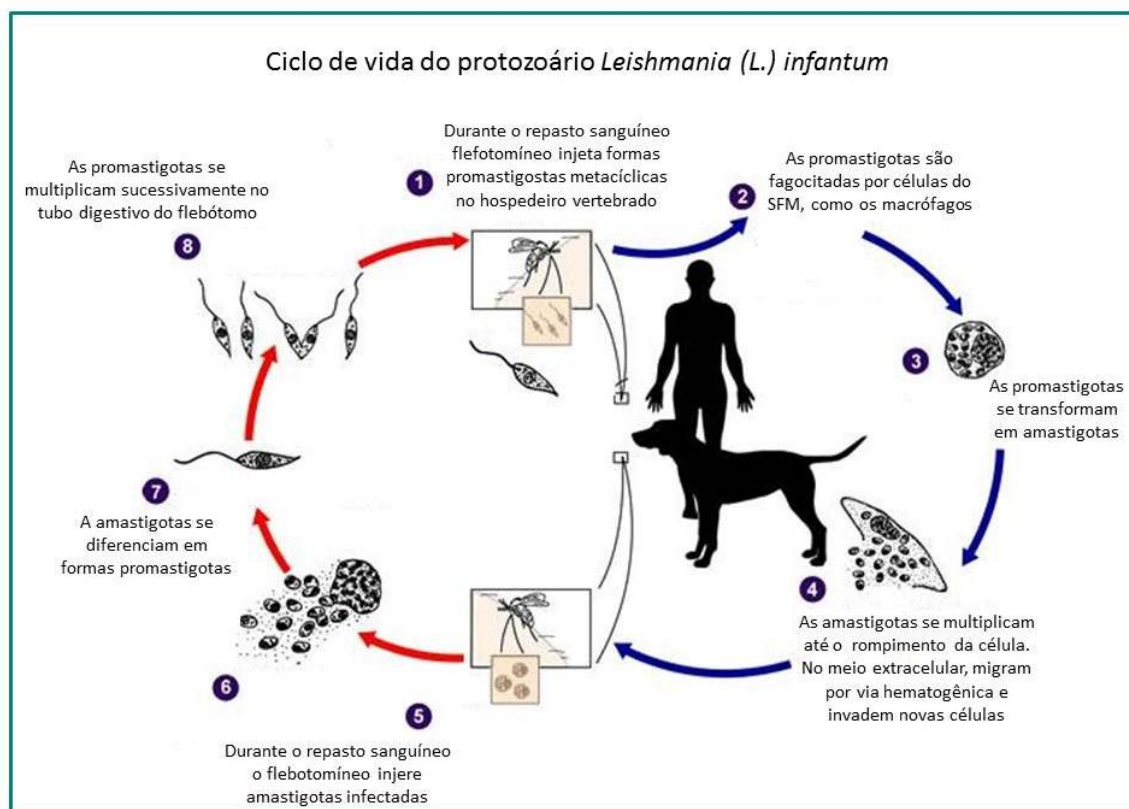


Figura 5 – Ciclo de vida do protozoário *Leishmania infantum* nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. Modificado de CDC, 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

2.8 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, no ano de 2019, 83 países foram considerados endêmicos para LV no mundo. A doença é negligenciada e acomete principalmente populações que vivem em situação de pobreza e baixo nível econômico. Estima-se que sejam mais de 300 mil casos por ano, com mais de 20 mil mortes. Em 2018, os países da África Oriental (Etiópia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Uganda) notificaram 45% do total de casos globais de LV, os países do subcontinente indiano (Bangladesh, Índia e Nepal) notificaram 28%, e o Brasil notificou 20%. Vale ressaltar que Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão juntos representam 83% de todos os casos do mundo de LV. E nas Américas, 97% dos casos são notificados no Brasil (WHO, 2018; PAHO, 2019; RUIZ-POSTIGO, 2020).

Nas últimas décadas a LV vem sofrendo urbanização, com expansão da doença para os grandes centros do país, como as regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste (SILVEIRA et al., 2016; RIBOLDI et al., 2018; BOECHAT et al., 2020). O surgimento de novas áreas endêmicas se deve às alterações antropogênicas que provocam mudanças ambientais, como o desmatamento, a destruição de habitats, o processo de urbanização crescente e desorganizado, o esvaziamento rural e as mudanças socioeconômicas (BRASIL, 2014). Devido a isso, atualmente o vetor *Lu. longipalpis* adaptou-se ao meio urbano, utilizando matéria orgânica presente no solo para o seu desenvolvimento e vivendo no peridomicílio em abrigo de animais e no domicílio, em periferias e vegetações de encostas parcialmente desmatadas de morros (REY, 2010).

No estado do Rio de Janeiro, região Sudeste do Brasil, o primeiro caso de LV foi reportado no ano de 1977, na encosta da Serra de Bangu, região norte do maciço da Pedra Branca (MARZOCHI et al., 1985). A confirmação da autoctonia do caso se deu através da detecção de presença do flebótomo *Lu. Longipalpis* e inquérito dos cães na região, sendo constatada a presença de formas amastigotas de *L. (L.) infantum* em um cão em corte histológico de fragmento de pele da orelha. Novos casos humanos da doença ocorreram em 1979, no bairro de Realengo, vizinho do bairro de ocorrência do primeiro caso de LV. No ano de 1980, o MS realizou um inquérito de cães provenientes dos bairros de Realengo, Bangu e Senador Camará, onde foram notificados casos de LVC e também, novos casos em humanos (MARZOCHI et al., 1981). Em 1982, novos casos de LV foram notificados no bairro da Barra da Tijuca, nas regiões de Vargem Grande, Grumari e Camorim, além de Rio Bonito e Piabas. No período de 1985 a 1996, houve aumento do número de casos de LV, que se disseminou para Guaratiba e outras localidades da Barra da Tijuca, as áreas de Grota Funda e Rio Bonito, além do bairro de Jacarepaguá, nas localidades da Taquara e Curicica. Até agosto de 2006, 87 casos de LV foram notificados nas regiões do maciço da Pedra Branca e do Gericinó na Zona Oeste do Rio de Janeiro (MARZOCHI et al., 2009).

Na Zona Sul do Rio de Janeiro, o primeiro caso autóctone de LVC foi relatado por Figueiredo e colaboradores (2010). O referido cão nasceu e era residente no bairro de Laranjeiras e nunca havia se deslocado do local. Apresentava sinais característicos de LVC e o diagnóstico sorológico foi realizado com o TR-DPP®, o qual foi positivo. O diagnóstico parasitológico se deu através do cultivo *in vitro* de fragmentos de pele, onde foram isoladas

formas promastigotas de *L. (L.) infantum* caracterizadas pela técnica de eletroforese de isoenzimas (FIGUEIREDO et al., 2010).

A primeira notificação de foco urbano de LVC no município do Rio de Janeiro ocorreu em 2011, no bairro do Cajú, no cemitério de São Francisco Xavier, com a confirmação de infecção de 25 animais avaliados por métodos parasitológicos. Além disso, a presença do vetor flebotomíneo também foi detectada na região (RIO DE JANEIRO, 2011). O primeiro relato de LV em humano foi descrito em 2014, na mesma região por Silva e colaboradores (2014), em uma mulher nascida e criada no bairro do Cajú, sem histórico de viagens, com sintomas característicos de LV, como febre intermitente, hepatomegalia e esplenomegalia. O teste parasitológico confirmou a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em aspirados de medula óssea. No mesmo período, novos casos da doença canina foram notificados no cemitério do Cajú (SILVA et al., 2014).

Nos últimos anos, durante o período de janeiro de 2018 até dezembro de 2021 o estado do Rio de Janeiro, notificou acometimentos humanos da doença em indivíduos residentes nos municípios do Rio de Janeiro, Volta Redonda, Vassouras, Barra Mansa, Cabo Frio, Laje do Muriaé, Barra do Pirai, Natividade, São João de Meriti e Niterói (RIO DE JANEIRO, 2019; 2021).

No município de Maricá, região metropolitana e do Estado do Rio de Janeiro, o primeiro caso autóctone reportado de LVC ocorreu em 2009 no bairro de Inoã, em um cão de 7 anos, que nasceu na região e nunca se ausentou do local, era considerado de companhia e vivia dentro da residência e ao seu redor, no quintal. O cão apresentava sinais e sintomas característicos de LVC e além do diagnóstico clínico, foi realizada cultura “*in vitro*” de amostras de fragmentos de pele, que possibilitou isolamento e identificação do parasito *L. (L.) infantum*, confirmando o caso de LVC (DE PAULA et al., 2009).

Oliveira e colaboradores (2015) descreveram os primeiros casos de LVC no município de Niterói, no bairro do Jacaré. Através de inquérito sorológico, 110 cães foram avaliados na região, no período de dezembro de 2011 a março de 2012, e 15,5% dos animais foram positivos no diagnóstico de referência preconizado pelo MS na época, formado pelos testes de ELISA e RIFI. Além disso, também foi empregado o protocolo recomendado nos dias atuais,

formado pelo TR-DPP® e o ELISA, que em conjunto demonstraram soropositividade para *L. (L.) infantum* de 20,9% (OLIVEIRA et al., 2015).

Até o ano de 2014, foram notificados em torno de 38 cães positivos no município de Niterói, a maioria residente na Região Oceânica. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram 9,3% (20/214) de cães positivos para *L. (L.) infantum* nos municípios de Niterói e Maricá (SPINELLI, 2018). Alguns bairros dos municípios citados apresentam ocupação desordenada e precárias condições sanitárias, o que pode ter facilitado a reprodução do flebótomo. Além disso, as cidades de Niterói e Maricá são consideradas áreas de baixa transmissão da LV, pois ainda não existem estudos que mencionem ocorrência de muitos casos autóctones de LV Humana na região (RODRIGUES et al., 2013; NITERÓI, 2015; SPINELLI, 2018). Entretanto, foi notificado o primeiro caso de LV humana em um residente do município de Niterói (RIO DE JANEIRO, 2021). As áreas de baixa transmissão são importantes sentinelas, devendo haver monitoramento constante de casos para prevenir a dispersão do protozoário na região e evitar a ocorrência de casos humanos (ALENCAR, J.E., 1959).

2.9 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

O diagnóstico da LVC é realizado considerando-se aspectos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos (DEGRAVE et al., 1994). O diagnóstico clínico da infecção é de difícil determinação, uma vez que muitos cães não apresentam sintomas. E quando sintomáticos, os sinais clínicos apresentados podem ser confundidos, em decorrência da similaridade com outras doenças que acometem os cães na região, como a leishmaniose tegumentar, babesiose, erlichiose, parasitoses intestinais, dirofilariose, leptospirose e tripanossomíase (BARROURIM-MELO et al., 2006, MADEIRA et al., 2006).

Para o diagnóstico laboratorial da LVC podem ser empregados métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares (SOLANO-GALLEGO et al., 2017). Atualmente, o MS preconiza a utilização de dois métodos imunológicos de referência: o teste rápido Dual Path Platform (TR-DPP®) que é um método qualitativo e o primeiro a ser utilizado para uma triagem de amostras soropositivas; e o método quantitativo do ELISA (EIE®-LVC) que confirma o resultado (BRASIL, 2011). No entanto, até o ano de 2011 o diagnóstico de referência consistia na utilização do método do ELISA para triagem e a

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) como teste confirmatório (COURA-VITAL et al., 2011).

2.9.1 DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

O ensaio TR-DPP® é um teste imunocromatográfico constituído por uma membrana de nitrocelulose sensibilizada com proteínas recombinantes (k26 e k39) específicas de *Leishmania* spp. sendo utilizados a proteína A que se liga a fração Fc dos anticorpos específicos anti-*Leishmania* e ouro coloidal como partícula colorida ligada a ela. Se houver presença de anticorpos específicos na amostra testada, estes irão se ligar aos antígenos recombinantes, e quando em contato com a proteína A e ouro coloidal, se ligarão formando um complexo colorido (COURA-VITAL et al., 2013). O TR-DPP® apresenta vantagens como reprodutibilidade e pode ser utilizado em campo com amostra de sangue total, soro ou plasma, apresentando rapidez e simplicidade, pois não exige equipamentos laboratoriais ou profissionais treinados com especialização técnica para sua realização (FIGUEIREDO et al., 2018).

No teste sorológico de ELISA ocorre uma reação entre anticorpos presentes nas amostras de soro canino que se ligam a antígenos de *Leishmania* spp. fixados em microplacas. A visualização da reação se dá através de uma anti-imunoglobulina conjugada com uma enzima, com a adição de substrato cromógeno que gera cor e pode ser medido por espectrofotometria (LAMOTHE et al., 2004). O teste de ELISA comporta um maior número de amostras em uma mesma reação, quando comparado a outros testes imunológicos. Além disso, o resultado pode ser automatizado, garantindo mais rapidez e eliminando erros na leitura (FARIA & ANDRADE, 2012).

O teste de RIFI, embora não seja mais aplicado como referência para confirmação de casos de LVC, ainda é muito utilizado como método complementar (Di PIETRO et al., 2020). A reação baseia-se na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. presentes no soro canino. Estes se ligam ao antígeno fixado previamente em lâminas de microscopia. Para visualização da reação utiliza-se um conjugado fluorescente e a leitura é realizada em microscopia de campo escuro (BIO-MANGUINHOS, 2008). No entanto, o método demanda tempo para sua leitura e necessita de especialização técnica para sua realização (TRONCARELLI, 2009).

A utilização dos testes imunológicos de referência tem como principal objetivo acelerar o diagnóstico da LVC visando identificar os reservatórios infectados na região estudada (BRASIL, 2011). Além disso, os métodos de referência de TR-DPP® e ELISA demandam um baixo custo de investimento, são de rápida execução e a leitura automatizada elimina subjetividade de técnicos (PACHECO et al., 2015).

Entretanto, os métodos imunológicos de referência foram padronizados em áreas endêmicas (Brasil, 2011). Em áreas de baixa transmissão, os cães infectados podem apresentar uma menor carga parasitária e baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania*, principalmente em cães assintomáticos, e dessa forma não serem detectados através destes testes, o que torna o diagnóstico da LVC mais difícil nessas regiões (RIBOLDI et al., 2018; de CARVALHO et al., 2018).

Além disso, os testes sorológicos apresentam limitações, principalmente relacionadas a sensibilidade, a qual está diretamente relacionada a sintomatologia do cão, onde uma menor sensibilidade é observada em cães assintomáticos ou no início da infecção. Isto se deve, principalmente, ao fato de animais nessas condições possuírem baixa carga parasitária e baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* (de CARVALHO et al., 2018). Uma outra desvantagem, é o fato de que estes métodos podem apresentar reações cruzadas com outras espécies de protozoários, principalmente outros tripanossomatídeos, o que pode impedir a identificação correta da infecção no cão (TRONCARELLI et al., 2009; GRIMALDI et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2018).

Um estudo desenvolvido por Rocha e colaboradores (2020), demonstrou a importância do acompanhamento imunológico de cães com sorologia negativa ou indeterminada para LVC em região de recente transmissão. O estudo observacional avaliou 6.667 cães utilizando um protocolo de diagnóstico sorológico, utilizando o TR-DPP® e ELISA com repetições semestrais. Esta análise ocorreu durante um período de dois anos (agosto de 2015 a fevereiro de 2017). Os resultados do estudo demonstraram que a maior taxa de soroconversão, período no qual os anticorpos se tornam detectáveis na sorologia, ocorreu somente após nove meses, onde 65,4% dos cães se tornaram positivos sorologicamente. Esses autores também realizaram o xenodiagnóstico, onde foi observado que durante todo o período de pesquisa, os animais infectados com resultado indeterminado no diagnóstico de referência eram tão infectantes para os vetores *Lu. longipalpis* como os soropositivos. Isto demonstra a importância da

utilização de métodos mais eficazes para o diagnóstico da LVC nessas regiões, para identificar pontualmente os reservatórios e diminuir as chances de resultados falso negativos (ROCHA et. al., 2020).

De Carvalho e colaboradores (2018), realizaram um estudo com 140 amostras de soro de cães em uma região não endêmica para LVC no Estado do Rio Grande do Sul. Foi realizada uma comparação no desempenho dos testes sorológicos e moleculares. Com a utilização dos métodos de referência 35,7% dos cães foram positivos na região. Por outro lado, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real (qPCR) detectou 41,4% de cães infectados. Além de apresentar melhor desempenho na identificação dos animais infectados, o emprego do diagnóstico molecular demonstrou maior homogeneidade em amostras de cães em diferentes estágios da infecção e alta capacidade de detecção de DNA do parasito. Diante disso, se torna necessária a utilização de técnicas mais eficazes e precisas para o diagnóstico da LVC em regiões de baixa transmissão. Neste contexto, a utilização da PCR como diagnóstico molecular apresentou um melhor desempenho diagnóstico na detecção de reservatórios infectados (de Carvalho et al., 2018).

2.9.2 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

O diagnóstico parasitológico permite a observação direta dos parasitos do gênero *Leishmania*. Neste, estão inclusos os métodos de cultivo *in vitro* de tecidos, que são realizados em meio de cultura bifásico e observados em microscopia óptica semanalmente; o xenodiagnóstico, que pode ser direto (*in vivo*) ou indireto (*in vitro*); o exame a fresco em microscopia óptica para visualização do parasito; a impressão por aposição (*imprint*) tecidual em lâmina, seguido de coloração e observação em microscópio óptico (ROQUE, 2011).

Através do diagnóstico parasitológico direto são realizados esfregaços de aspirados de baço, medula óssea ou linfonodo com posterior coloração de Giemsa e visualização em microscópio óptico. É uma metodologia rápida e de baixo custo, na qual a sensibilidade está relacionada a distribuição e carga parasitária do tecido de escolha e a habilidade técnica de leitura. A visualização direta de amostras de tecidos é muito utilizada devido a simplicidade e custo-benefício. Através deste método não é possível distinguir a espécie de *Leishmania* infectante (AKHOUNDI et al., 2013; 2017).

O xenodiagnóstico é feito para avaliar a capacidade de transferência de *Leishmania infantum* em animais experimentais para o vetor *Lutzomyia longipalpis* (ROCHA et al., 2020). Posteriormente o material biológico é analisado para isolamento de parasitos. O método apresenta baixa sensibilidade, elevado custo e demanda tempo, infraestrutura e equipamentos para sua realização. No entanto, a técnica ainda é muito utilizada, pois é capaz de realizar a avaliação da transmissibilidade de cães infectados por *L. (L.) infantum* ao vetor flebotomíneo (AKHOUNDI et al., 2017; TRAVI et al., 2018).

Por meio da realização do cultivo *in vitro*, formas promastigotas do parasito podem ser visualizadas a partir de amostras obtidas por biópsia ou punção dos tecidos de pele, linfonodos, medula óssea e baço (GRADONI & GRAMICCIA, 2008). A cultura é realizada em tubos utilizando um meio bifásico contendo fase sólida de Ágar sangue, sendo o Novy, McNeal e Nicolle (NNN) o mais aplicado, e o meio líquido Schneider, suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico (penicilina e estreptomicina). Os tubos são mantidos em estufas a 28°C por no máximo quatro semanas. As amostras são consideradas positivas quando há observação do parasito através de microscopia óptica. Em caso positivo, os parasitos podem ser ampliados e criopreservados para posterior caracterização por métodos moleculares (MESQUITA & RODRIGUES, 2013).

O cultivo *in vitro* é um método muito utilizado como diagnóstico complementar da LVC, pois apresenta especificidade de aproximadamente 100%, no entanto, a sensibilidade pode variar de acordo com o tipo de amostra utilizada, o estágio da infecção canina e a carga parasitária do tecido avaliado. Vale ressaltar que algumas amostras dependem de métodos de coleta invasivos, o que pode gerar riscos ao animal, além de serem impraticáveis no campo devido ao curto espaço de tempo (BRASIL, 2014). Por outro lado, o cultivo *in vitro* a partir de amostras de pele e medula apresenta alta especificidade e sensibilidade quando associados à técnica de caracterização por isoenzimas (SILVA et al. 2011), onde é possível a caracterização da espécie infectante (CUPOLILO, 1994). Os isolados obtidos da cultura também podem ser submetidos à técnica de PCR para identificação do DNA de *Leishmania* sp. (LOPES et al., 2020). Contudo, a realização da cultura exige tempo, investimento, equipamentos específicos, além de pessoal treinado para realizar leituras semanais. Além disso, outra desvantagem está relacionada a suscetibilidade a contaminação microbiológica, o que leva ao descarte da cultura (MAIA & CAMPINO, 2008; LAURENTI, 2009).

2.9.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

De Andrade e colaboradores (2018), demonstraram em estudo epidemiológico, que a utilização do diagnóstico molecular por meio da PCR, quando comparada aos testes de TR-DPP e ELISA, apresentou maior sensibilidade, especificidade e homogeneidade em relação ao diagnóstico de cães em diferentes estágios da infecção (sintomáticos e assintomáticos).

A PCR se baseia na amplificação de milhares de cópias de uma sequência alvo do DNA do parasito utilizando uma enzima termoestável, a DNA polimerase, e um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). A amplificação do alvo molecular se dá em ciclos de desnaturação, hibridização e alongamento (ROGERS et al., 1990). A reação pode apresentar maior sensibilidade e especificidade que os métodos sorológicos, além disso, o alvo molecular do parasito pode ser amplificado a partir de diferentes tecidos, mesmo em pouca quantidade amostral (BRITTO & PEREIRA, 2014).

Os alvos moleculares mais utilizados para detecção de espécies de *Leishmania* se baseiam em regiões dos minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA); do Espaçador Transcrito Externo (ITS-1) que é uma região espaçadora dos genes do DNA ribossomal; da subunidade 18S do RNA Ribossômico (18S rRNA); da glicoproteína-63 kDa (gp-63) e da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) (ROGERS et al., 1990; GRAÇA et al., 2012; GUERBOUJ et al., 2014).

O DNA do cinetoplasto (kDNA) é formado por dois componentes, os maxicírculos e os minicírculos. Os maxicírculos estão presentes em cerca de 30 a 50 cópias no kDNA e carregam RNA ribossomal e enzimas mitocondriais (DEGRAVE et al., 1994). Os minicírculos são pequenas moléculas, e estão presentes de 5.000 a 10.000, representando 95% do kDNA da maioria das espécies de tripanossomatídeos (SHAPIRO & ENGLUND, 1995), essas moléculas apresentam uma região conservada de aproximadamente 200 pares de base (pb) entre todas as espécies de *Leishmania*. A região do minicírculo é o alvo molecular mais utilizado para detecção de *Leishmania* sp. utilizando diferentes oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de porções desta região. A reação de amplificação de uma região de 120pb da região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania* sp. foi proposta por Rogers e colaboradores (Figura 6) (ROGERS et al., 1990; DEGRAVE et al., 1994).

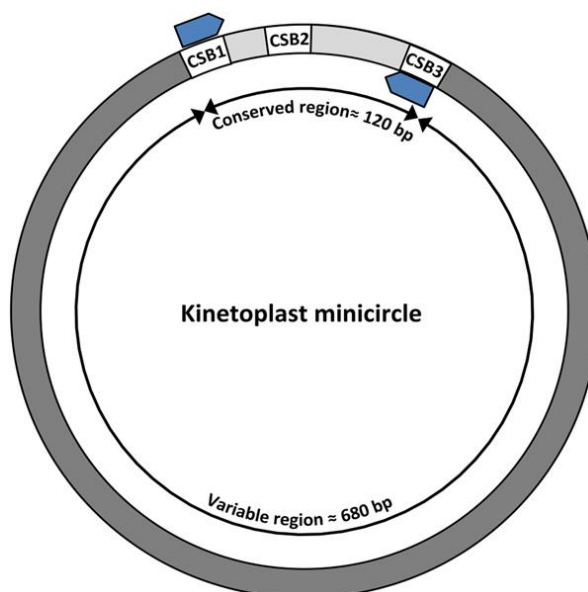


Figura 6 – Organização estrutural dos minicírculos do DNA do cinetoplasto. As setas indicam a região variável e a região conservada (fragmento de 120pb). Fonte: KOCHER et al., 2018.

Um estudo realizado por Bezerra-Vasconcelos e colaboradores (2011) apresentou sensibilidade ótima com a utilização do alvo kDNA, com capacidade de detecção de DNA de aproximadamente 0.004 parasitos. O estudo comparou genes com números de cópias distintos para detecção de DNA de *L. (L.) infantum*. Foram utilizados os alvos moleculares kDNA, 18S rRNA e polimerase α através da técnica de PCR em tempo real (qPCR) (BEZERRA-VASCONCELOS et al., 2011). Os resultados de Mahammadiha e colaboradores (2013), demonstram uma alta sensibilidade e especificidade do alvo kDNA. A amplificação deste alvo utilizando a PCR convencional em amostras caninas de sangue constatou sensibilidade de 88,9% e especificidade de 94,6%, respectivamente. No entanto, a PCR convencional para amplificação do alvo ITS-1 obteve sensibilidade de 72,2% e especificidade de 89,3% (MAHAMMADIHA et al., 2013).

As Proteínas do Choque Térmico (HSPs) conferem proteção e manutenção celular. Estas interagem com outras proteínas e auxiliam no transporte, síntese e diversas outras funções celulares. As HSPs são classificadas de acordo com o peso molecular em seis famílias: Pequenas HSPs, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 e HSP100 (CASTRO et al., 2013). As HSP70 estão presentes de 10 a 15 cópias conservadas no DNA do parasito, possuindo importante papel no controle da diferenciação e proliferação celular (MCFARLANE et al., 1990; KREGEL, 2002; BUKAU et al., 2006).

O gene HSP70 é altamente conservado e polimórfico e permite a identificação precisa de espécies de *Leishmania* sp. (GRAÇA et al.; CAVALCANTI et al., 2012; HERRERA et al., 2019; ARBELÁEZ et al., 2020). A amplificação de uma região específica de 234pb do gene HSP70 como alvo molecular foi proposta por Graça e colaboradores (2012) em estudo que buscou determinar uma ferramenta molecular específica para o diagnóstico de *Leishmania* sp. (Figura 7). Para isto, foram desenvolvidos pares de iniciadores para amplificação de diferentes regiões do gene da HSP70, no qual os fragmentos variavam de 230-390 pb. A região específica de 234 pb no gene hsp70 demonstrou alta sensibilidade na detecção de DNA de espécies de *Leishmania*. Além disso, foi realizada uma comparação entre os alvos moleculares de kDNA, ITS1, glicose 6 fosfato desidrogenase e HSP70-234pb. De acordo com os resultados a PCR HSP70-234pb empregada com a técnica de Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) apresentou capacidade superior de detecção e identificação de espécies de *Leishmania* (GRAÇA et al., 2012).

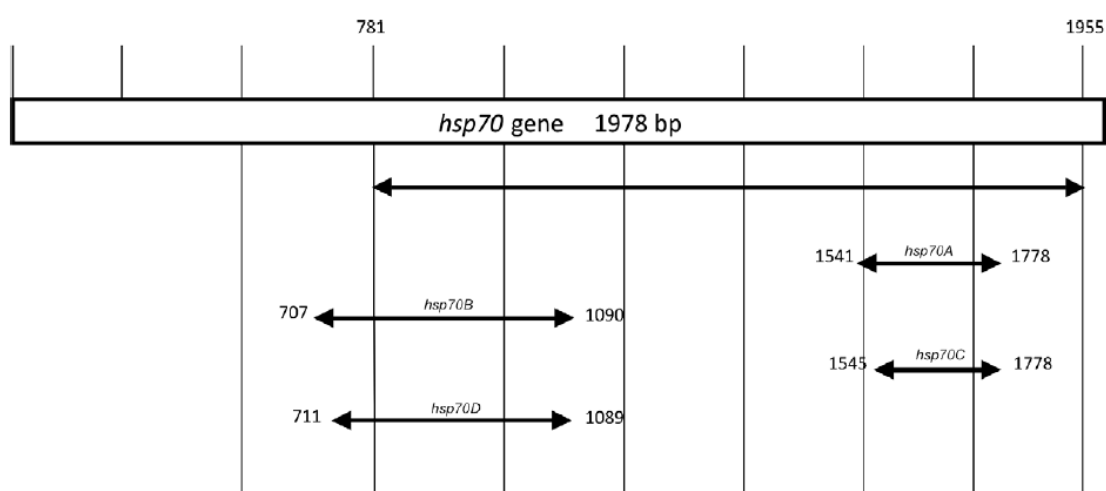


Figura 7 - Tamanho e posição dos fragmentos amplificados do gene da Proteína do Choque Térmico 70 kDa no cromossomo 28 de *Leishmania major*, utilizando diferentes pares de iniciadores através da PCR. HSP70A: 230 pb; HSP70B: 384 pb; HSP70C: 234 pb; HSP70D: 379 pb. Fonte: GRAÇA et al., 2012

Zampieri e colaboradores descreveram a amplificação da mesma sequência HSP70-234pb empregando o protocolo de Análise de Dissociação de Alta Resolução (*High resolution melting*- HRM) utilizando amostras de reservatórios e flebotomíneos infectados. Os resultados descreveram a identificação precisa e com alta sensibilidade de todas as espécies de *Leishmania* circulantes no Brasil, Eurásia e África (ZAMPIERI et al., 2016).

A capacidade de detecção e identificação de *Leishmania* spp. utilizando técnicas moleculares, está diretamente ligada ao tipo de amostra utilizada, além do alvo molecular empregado (TRAVI, 2018). Isto se deve ao fato de que a distribuição de parasitos nos tecidos não é homogênea, principalmente devido ao tropismo da cada cepa de *Leishmania* e da resposta imune local (MAIA; CAMPINO, 2008). As amostras utilizadas no diagnóstico molecular das leishmanioses são principalmente provenientes dos tecidos do baço, linfonodo, pele, medula óssea e sangue. Também são utilizados *swab* de conjuntiva e oral, além de amostras do trato genital de cães (TRAVI et al., 2018; BOECHAT et. Al. 2020).

Estudos apontam que amostras de pele e medula óssea apresentam maior carga parasitária, comparadas a amostras de sangue periférico (LARA-SILVA et al., 2015; LOPES et al., 2020; CHAGAS et al., 2021). A pele apresenta grande quantidade de parasitos e caracteriza-se por ser um tecido de fácil obtenção. Já amostras de aspirados de medula óssea, apesar de possuir ótimo desempenho em relação à detecção de DNA do parasito, é um tecido de coleta mais invasiva (RIBOLDI et. al., 2018; LOPES et. al. 2020).

2.10 PREVENÇÃO E CONTROLE

As medidas de controle para LV preconizadas pelo MS são: o tratamento precoce de casos humanos; controle do vetor em área endêmica, com a utilização de inseticidas; a identificação e a eutanásia de cães infectados e medidas de educação em saúde relacionadas a doença (BRASIL, 2014). Muitos países endêmicos para LV realizam a eutanásia de cães infectados como medida de controle da doença (ALVAR et. al., 2012). Na América do Sul, em países como o Brasil, Colômbia, Venezuela, Uruguai e Argentina, a eutanásia é oficialmente recomendada (DANTAS-TORRES et. al., 2018). No Brasil a vigilância epidemiológica da LV prevista pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) possui como medida de controle a eutanásia de cães infectados (BRASIL, 2014). No país esta prática é indicada a cães soropositivos, ocorrendo desde 1963 e estima-se que milhões de animais foram submetidos a eutanásia nos últimos 60 anos no país (ALVES et. al., 2004). No entanto, pesquisas demonstram que a eutanásia como medida única não é eficaz para a diminuição de casos e controle da LVC, além de gerar conflitos e dificuldade de adesão da prática devido a fatores éticos e sociais (REGUERA et al.; SEVÁ et al., 2016 ; DANTAS-TORRES et. al., 2018; 2019).

Estudos têm demonstrado que a metodologia diagnóstica recomendada pelo MS brasileiro pode apresentar baixa sensibilidade e especificidade, principalmente em regiões de baixa transmissão. O que pode resultar na eutanásia de cães falso positivos e/ou na permanência de reservatórios no ambiente. Além disso, em uma perspectiva epidemiológica, os cães submetidos a eutanásia podem ser substituídos por outros reservatórios devido a presença do vetor e hospedeiros potenciais, o que viabiliza a continuidade do ciclo do parasito. Do ponto de vista social, a eutanásia de animais não é uma medida bem-vista pela população, o que pode levar a uma atenuação na adesão do programa por falta de consentimento do tutor do cão. Contudo, para o controle efetivo da LV, as estratégias de prevenção devem enfatizar medidas que foquem principalmente no parasito e no vetor, a fim de reduzir a interação entre vetor, reservatórios e hospedeiro suscetível, para assim interromper o ciclo do parasito (DANTAS-TORRES et al., 2018; GÁLVEZ et al., 2018; TRAVI et al., 2018; PESSOA-E-SILVA; 2019).

No entanto, a prática da eutanásia de animais soropositivos ainda é preconizada pelo MS brasileiro no intuito de diminuir os riscos de transmissão (BRASIL, 2014). De acordo com Menezes e colaboradores (2016) a eutanásia é uma prática que deve ser associada a outras medidas preventivas para reduzir risco de surtos de Leishmanioses. Nos últimos anos, algumas medidas preventivas vêm sendo utilizadas, como o uso tópico de inseticidas, coleiras impregnadas com inseticida e a utilização de mosquiteiros nas casas, que previne contra picadas do vetor flebotomíneo e diminui o risco de infecção por *L. (L.) infantum* (DANTAS-TORRES et. al., 2019). A vacinação dos cães reduz o risco de desenvolvimento da doença e o uso de medicamentos (como o tratamento com miltefosina) pode atenuar a infecciosidade do cão (MIRÓ et. al, 2017; TRAVI et. al, 2018). Além disso, melhorias nas condições ambientais, de habitação e a educação em saúde podem promover a redução e controle do flebotomíneo e reduzir a exposição ao vetor (BRASIL, 2020).

Para a prevenção e o controle da LV, o diagnóstico é uma etapa importante e deve contar com a utilização de métodos eficazes (AKHOUNDI et al.,2017). A metodologia diagnóstica preconizada pelo MS pode apresentar baixa sensibilidade em cães provenientes de regiões de baixa transmissão (DE CARVALHO et al., 2018). Contudo, a realização da técnica de PCR para o diagnóstico da LVC pode ser uma proposta viável para os centros de referência e laboratórios de pesquisa. Dessa forma, a junção dos métodos imunológicos de referência à PCR pode ser uma forma mais eficaz de realizar o diagnóstico de LVC em áreas de baixa

transmissão, de forma a notificar e eliminar possíveis reservatórios. Nesse contexto, é de suma importância o desenvolvimento de pesquisas que buscam otimizar a técnica de PCR, indicando o tecido canino e o alvo molecular para uma maior capacidade de detecção de DNA nestas áreas de baixa transmissão.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar a capacidade de detecção de DNA de *Leishmania* sp. em amostras clínicas (sangue periférico, aspirado de medula óssea e fragmento de pele íntegra) de cães infectados por *L. (L.) infantum* provenientes de área de baixa transmissão para leishmaniose visceral, confrontando ainda, os resultados dessa detecção com dados clínicos, parasitológicos de cultivo *in vitro* e sorológicos coletados previamente.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a presença de DNA de *Leishmania* sp. por meio de PCR convencional para o alvo molecular kDNA, em amostras de sangue periférico, aspirado de medula óssea e fragmento de pele íntegra de cães com leishmaniose visceral.
- Comparar a capacidade de detecção de DNA de *Leishmania* sp., por meio da PCR convencional para o alvo molecular kDNA, nos diferentes tecidos (sangue periférico, aspirado de medula óssea e pele íntegra) de cães com leishmaniose visceral.
- Investigar a presença de DNA de *Leishmania* sp. por meio de PCR convencional para o alvo molecular HSP70, em amostras de fragmento de pele íntegra de cães com leishmaniose visceral.
- Comparar os resultados de detecção de DNA de *Leishmania* sp. obtidos na PCR convencional para os alvos moleculares kDNA e HSP70 nas amostras de fragmentos de pele íntegra de cães com leishmaniose visceral.
- Comparar os resultados da detecção de DNA de *Leishmania* sp. com os dados clínicos, parasitológicos e sorológicos obtidos destes cães em estudo anterior.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS, LOCALIDADE E POPULAÇÃO DE ESTUDO

O presente estudo utilizou amostras, dados clínicos, parasitológicos de cultivo *in vitro* e sorológicos de 12 cães infectados por *L. (L.) infantum*. As amostras e os dados foram previamente coletados em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, de cães que residiam nas cidades de Niterói e Maricá (Figura 8), região considerada área de baixa transmissão de LV. De acordo com os dados epidemiológicos, 3 cães possuíam moradia na região oceânica de Niterói e 9 cães eram provenientes da cidade de Maricá (SPINELLI, 2018) (Tabela 1). As amostras foram previamente obtidas em parceria ao Laboratório Clínico Veterinário Flávia Uchôa (LCVFU), localizado em Niterói, que atende a clínicas veterinárias privadas na região do estudo. Os animais inclusos foram atendidos por médicos veterinários das clínicas em que o LCVFU presta serviço, e no momento da consulta foi esclarecido o objetivo da pesquisa ao tutor e posteriormente, oferecido a inclusão do animal no projeto.



Figura 8 – Regiões da população canina estudada. Os municípios de Niterói e Maricá, localizados na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. Modificado de SPINELLI (2018).

O critério de inclusão no presente estudo levou em consideração a positividade prévia (SPINELLI, 2018) no teste de triagem TR-DPP® (critério diagnóstico atual do MS) e no cultivo *in vitro* de pele e/ou medula, no qual as amostras foram caracterizadas como *L. (L.) infantum* pela técnica de izoenzimas (CUPOLILLO et. al., 1994). Foram utilizadas 35 amostras de 12 cães infectados por *L. (L.) infantum*, sendo estas: 12 fragmentos de pele

íntegra de região dorsal entre as escápulas, 11 aspirados de medula óssea de região do úmero, em sua tuberosidade maior e 12 amostras de sangue periférico. Para otimização das técnicas de PCR, foram utilizados ainda 14 isolados de *L. (L.) infantum* obtidos a partir de cultura *in vitro* da medula óssea (n=9) e pele íntegra (n=5) de 10 desses cães (Tabela 1).

Descrição das amostras						
Animais	Cidade	Aspirados de Medula	Fragmentos de pele	Sangue	Isolados cult. medula	Isolados cult. Pele
2	Niterói	+	+	+	-	-
3	Maricá	+	+	+	-	+
5	Niterói	+	+	+	+	+
6	Maricá	+	+	+	+	-
7	Maricá	+	+	+	+	-
9	Niterói	+	+	+	+	-
10	Maricá	+	+	+	+	+
14	Maricá	+	+	+	+	-
15	Maricá	+	+	+	+	+
16	Maricá	+	+	+	-	-
17	Maricá	+	+	+	+	+
20	Maricá	-	+	+	+	-

Legenda: (+): possui amostra, (-): ausência de amostra

Tabela 1 – Descrição das amostras de tecidos e isolados de *L. (L.) infantum* em cultura *in vitro* provenientes de cães de área de baixa transmissão nos municípios de Niterói e Maricá utilizados no presente estudo

As amostras clínicas dos cães encontravam-se armazenadas em freezers no Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense (UFF). Já os isolados de cultura *in vitro* e as amostras de referência (usadas como controles nas reações moleculares) encontravam-se criopreservadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LaPClinVigiLeish) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas INI-FIOCRUZ. Os dados clínicos, parasitológicos de cultivo *in vitro* e sorológicos obtidos previamente (SPINELLI, 2018), foram aqui utilizados com o intuito de comparação com as técnicas moleculares realizadas no presente estudo.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

As amostras biológicas (sangue periférico, fragmentos de pele integra e aspirados de medula óssea) e os dados clínicos utilizados para a realização dos exames descritos no presente estudo foram coletados e doados pelo Laboratório Clínico Veterinário Flávia Uchôa, por meio de assinatura de termo de doação. Os dados clínicos dos animais foram obtidos através de ficha clínica preenchida pelo médico veterinário responsável pelo animal, com anuência do tutor por meio de assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo). Desta forma, não houve manipulação dos animais vivos para atender aos objetivos deste estudo, sendo os fragmentos de tecidos e sangue colhidos no laboratório particular e a sobra doada para nosso estudo, não sendo necessária com isso a submissão a nenhuma comissão de ética animal.

4.3 OTIMIZAÇÃO DAS TÉCNICAS MOLECULARES

Inicialmente foi realizada uma otimização dos protocolos dos métodos moleculares (FAGUNDES et al. 2010; GRAÇA et al. 2012) utilizando as amostras de *L. (L.) infantum* isoladas de cultivo *in vitro*. Para tal, foram utilizadas massas parasitárias obtidas individualmente de 14 isolados de cultura, sendo 5 provenientes de amostras de fragmentos de pele e 9 de amostras de medula óssea de 10 dos 12 cães incluídos no presente estudo.

4.3.1 CULTURA *IN VITRO* DAS AMOSTRAS E EXPANSÃO DE CÉLULAS

As amostras de isolados de cultura foram retiradas do nitrogênio líquido e expandidas para obtenção de massa parasitária. Para tal, estas foram repicadas em garrafas contendo meio bifásico com fase sólida contendo NNN (Nicolle, Novy e McNeal) 0,015 % de ágar-ágar e 0,006 % de NaCl e meio líquido Schneider completo (suplementado com 200 U/mL de Penicilina, 200 µg/mL de Estreptomicina e 10 % de soro fetal bovino por Litro).

Foi inoculado 0,5ml de cada isolado em garrafas de cultivo, contendo meio bifásico. As garrafas foram colocadas em estufa biológica a 28°C e no terceiro e no quinto dia após a inoculação foram observadas em microscópio invertido para avaliação do crescimento celular, sendo acrescentado mais 5ml de meio Schneider completo quando o crescimento era muito intenso. Após a expansão parasitária *in vitro*, com as amostras em fase exponencial de crescimento (aproximadamente no 5^o dia), foi realizada a técnica de obtenção de massa

parasitária, conforme descrição de Coutinho et. al. (2011). As amostras foram então transferidas para tubos cônicos de 50 ml e submetidas a centrifugação a 7000 rpm, a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado em tampão de lavagem (0,0085 % de NaCl e 0,00372% - pH – 8). Esse processo foi repetido por duas vezes. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em 1ml de tampão de lavagem e transferido para tubo de criopreservação de 2ml. O tubo foi centrifugado nas condições de centrifugação descritas acima e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi armazenado em freezer a -20°C até análise molecular.

4.4 ANÁLISES MOLECULARES

As análises moleculares foram realizadas no LaPClinVigiLeish da FIOCRUZ. Para evitar contaminações, as etapas das análises moleculares foram realizadas em estações diferentes (extração de DNA e aplicação das amostras, preparação da mistura dos reagentes de PCR, amplificação, preparação e corrida do gel de agarose). A extração do material genético das amostras de cultura e tecidos foi realizada com o kit Wizard™ Purelink Genomic DNA® (Promega, WI, USA). Para a extração foi feito um controle negativo com H₂O ultrapura comercial para se verificar se houve presença de contaminação durante a extração de DNA. As reações de PCR possuíam dois controles negativos, um da extração (H₂O ultrapura) e um da reação de PCR (H₂O Milli Q). Também foram utilizados como controle da reação amostras de DNA provenientes de cepas de referência de tripanossomatídeos das espécies: *L. (L.) infantum* (579 – MHOM/BR/1974/PP75), *L. (V.) brasiliensis* (566 – MHOM/BR/1975/M2903), *L. (L.) mexicana* (561 – MHOM/BZ/1982/BEL21) e *Trypanosoma caninum* previamente caracterizado por izoenzimas (CUPOLILLO et. al., 1994). Para o diagnóstico de *Leishmania* sp. foram utilizados dois alvos moleculares: o kDNA que foi usado nas amostras de medula, pele e sangue e o HSP70 que devido a pandemia de Covid-19 foi somente utilizado nos fragmentos de pele íntegra.

4.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE ISOLADOS DE CULTURA

A extração de DNA das amostras de isolados de cultura de *L. (L.) infantum* foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante do kit Wizard™ Purelink Genomic DNA® (Promega, WI, USA) com uma modificação na etapa de preparação do tecido, na qual foi adicionada 100 µL de Solução de lise do núcleo, ao invés dos 600 µL

indicados no protocolo do kit (kit Wizard™ Purelink Genomic DNA® Promega) a fim de otimizar a reação de extração de DNA.

O DNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro Biophotometer eppendorf 8,5 mm Light Center Height com leitura realizada a 260 nm, para dosagem da quantidade de DNA e cálculo da relação de pureza, permitindo a avaliação de potenciais contaminações com RNA ou proteína. O DNA foi considerado contaminado por proteína quando a relação de pureza foi igual ou menor que 1,5 e foi considerado contaminado por RNA quando apresentou relação de pureza igual ou maior que 2,0 (LEHNINGER et al., 2004).

Posteriormente, as amostras com valor maior que 50ng/μL de DNA na leitura da quantificação foram submetidas a um ajuste de concentração, sendo diluídas com água ultrapura para alcançar este valor final. Tal ajuste foi realizado pois amostras com valor final maior que 50ng/μL de DNA poderiam apresentar perfil de arraste na PCR (SANTOS, 2019). Após o ajuste, as amostras foram submetidas as reações de PCR para os alvos kDNA e HSP70. O desenho experimental dos métodos empregados em amostras de isolados de cultura pode ser observado na figura 9.

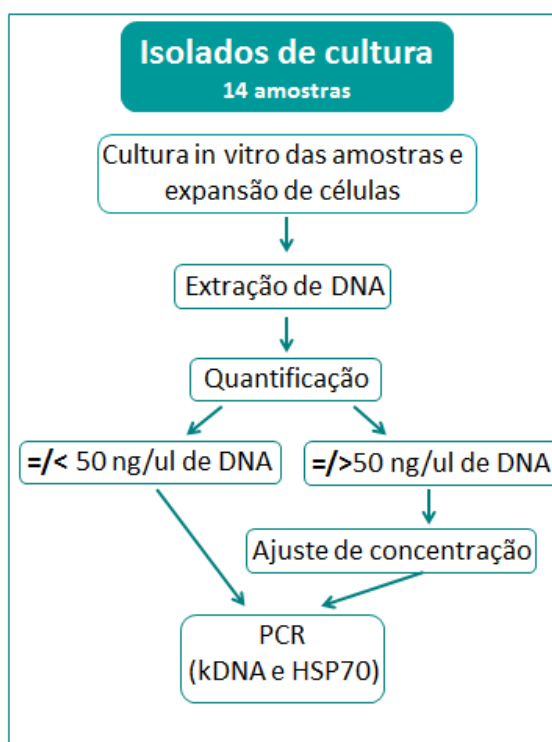


Figura 9 - Desenho experimental dos métodos empregados em amostras de isolados de cultura.

4.4.2 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE FRAGMENTOS DE PELE

A extração de DNA dos fragmentos de pele foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante do kit Wizard™ Purelink Genomic DNA® (Promega, WI, USA) com modificação na etapa de preparação do tecido, sendo este incubado em banho seco a 65°C durante 3 horas (diferente do protocolo original que tem como tempo de incubação de 15 a 30 minutos), a fim de otimizar a reação.

A quantificação de DNA do produto extraído foi realizada por espectrofotometria no aparelho Biophotometer eppendorf 8,5 mm Light Center Height, conforme descrito anteriormente no item 4.4.1. Após quantificação, as amostras de DNA foram submetidas a reações de PCR para os alvos kDNA e HSP70.

4.4.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE ASPIRADOS DE MEDULA ÓSSEA

A extração de DNA das amostras de aspirado de medula foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante do kit Wizard™ Purelink Genomic DNA® (Promega, WI, USA) com modificação do protocolo na etapa de preparação do tecido, o qual foi incubado em banho seco a 65°C por 1 hora (o protocolo original indica incubação de 15 a 30 minutos), a fim de otimizar a reação de extração de DNA.

A quantificação de DNA do produto extraído foi realizada por espectrofotometria no aparelho Biophotometer eppendorf 8,5 mm Light Center Height, conforme descrito anteriormente no item 4.4.1. Todas as amostras apresentaram pouca quantidade de DNA (valor muito menor que 50ng/μL) e foram submetidas a dois processos de centrifugação à vácuo no Concentrator plus/ Eppendorf disponibilizado pela equipe do Laboratório interdisciplinar de pesquisas médicas (LIPMED/IOC) a 14.000 rpm em três ciclos de 10 minutos. Após a concentração, as amostras foram novamente quantificadas e submetidas a reações de PCR para o alvo kDNA.

4.4.4 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE SANGUE

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante do kit Wizard™ Purelink Genomic DNA® (Promega, WI, USA) com modificação na etapa de preparação do tecido. Brevemente, foi adicionado aproximadamente 1g de micropérolas de vidro (Glass beads, acid-washed – Sigma) em tubos de 2ml estéreis e identificados, com posterior adição de 100 µL da amostra, e o tubo foi agitado em vórtex por um minuto. A inclusão das micropérolas de vidro teve por objetivo lisar as redes de fibrina que formam coágulos no sangue e dificultam a extração de DNA, otimizando o processo.

A quantificação de DNA do produto extraído foi realizada por espectrofotometria no aparelho Biophotometer eppendorf 8,5 mm Light Center Height, conforme descrito no item 4.4.1. Todas as amostras apresentaram pouca quantidade de DNA (valor muito menor que 50ng/µl) e foram submetidas a dois processos de centrifugação a vácuo no Concentrator plus/Eppendorf disponibilizado pela equipe do Laboratório interdisciplinar de pesquisas médicas (LIPMED/IOC) conforme descrito no item 4.4.3. Após a concentração, as amostras foram novamente quantificadas e submetidas a reações de PCR para o alvo kDNA.

4.4.5 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE

Foram realizadas duas reações de PCR convencional, uma para cada alvo molecular: kDNA e HSP70.

O alvo kDNA amplifica uma região conservada de 120pb dos minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* sp. Todas as amostras de isolados de cultura, fragmentos de pele íntegra, aspirados de medula óssea e sangue periférico foram submetidas a PCR para este alvo. A reação de PCR para o alvo kDNA foi realizada conforme descrito por Fagundes e colaboradores (2010). A mistura para a reação possuía um volume final de 25µl. Sendo 10 ng de cada iniciador [senso (5'-(G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3') e anti-senso (5'-GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3')], 200 µM de dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, California), 2,5 unidades de Taq polimerase (Amplitaq Gold, Perkin-Elmer, Norwalk, CT), 1,5 µM MgCl₂ e 5 µL de DNA. A mistura foi levada para um termociclador (T960 Touch Thermal Cycler –

Trace Lab) para amplificação a partir do ciclo de 94°C por 10 minutos, 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e etapa final de 72°C por 10 minutos.

A fim de amplificar uma região conservada de 234pb do gene da Proteína do Choque Térmico 70 (HSP70) de *Leishmania* sp., foi realizada a PCR para o alvo HSP70. Este ensaio foi apenas realizado em isolados de cultura e fragmentos de pele íntegra. A PCR para o alvo HSP70 foi executada segundo descrito por Graça e colaboradores (2012). A reação foi realizada com volume final de 25µl, sendo 10 pmol de cada iniciador (Senso 5'-GGACGAGATCGAGCGCATGGT-3' e anti-senso 5'-TCCTTCG ACGCCTCCTGGTTG-3'), 1,5 µM de MgCl₂, 0,8 µM de dNTPs (Pharmacia) e 1U da enzima Taq DNA Polimerase (Amplitaq Gold, Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.), tampão (fornecido pelo fabricante) e 5µL de DNA. O tubo com a mistura foi direcionado ao termociclador para amplificar a região desejada, através de um ciclo de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 61°C por 1 minuto, 72°C por 3 minutos, e um ciclo final de 72°C por 8 minutos.

Os produtos amplificados das reações de PCR para os alvos kDNA e HSP70 foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%. Foi utilizado o corante Blue Juice Gel Loading Buffer (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) para o acompanhamento da corrida das amostras e a coloração do gel foi realizada utilizando gel red (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain- Biotium). O marcador de peso molecular (Ladder 100 PB – Ludwig Biotec) utilizado foi de 100 pb. A corrida do gel se deu em 80 amperes durante 40 minutos. O peso molecular dos fragmentos foi comparado ao padrão do peso molecular de 100pb, sendo considerado positivo quando amplificado um fragmento do gene kDNA de aproximadamente 120pb e para o HSP70 de 234pb. A visualização foi realizada em fotodocumentador para gel de eletroforese (L-Pix EX - Locus).

Devido ao insucesso da PCR para o alvo kDNA no sangue, foi realizado um teste de inibição, a fim de determinar a presença ou ausência de inibidores na reação. Para isto, foi realizada uma PCR convencional, utilizando o alvo molecular PC03/PC04 que amplifica uma sequência de aproximadamente 100pb do gene da βglobina. Foram inclusos um controle positivo (amostra de fezes de cão previamente testada positiva) e um controle negativo (água Milli Q). A PCR foi executada conforme descrito por (RAMÍREZ et al., 2009). A mistura para a reação possuía um volume final de 50 µL. Sendo 56 pmol de cada iniciador, PC03 (5'-

CAACTTCATCCACGTTTCACC -3') e PC04 (3'- ACACAAACTGTGTTCCTACTAGC -5'), 0.2 mM de dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, California), 2,5 unidades de Taq polimerase (Platinum Pfx – Invitrogen), 3 mM MgCl₂ e 5 µL de DNA. A mistura foi levada para um termociclador para amplificação a partir do ciclo de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos e etapa final de 72°C por 7 minutos.

Os produtos amplificados da reação de PCR para o alvo PC03/PC04 foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%. Foi utilizado o corante Blue Juice Gel Loading Buffer (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) para o acompanhamento da corrida das amostras. Para a coloração, o gel foi submerso em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL, durante 30 minutos. O marcador de peso molecular (Ladder 100 PB – Ludwig Biotec) utilizado foi de 100 pb. A corrida do gel se deu em 80 amperes durante 40 minutos. O peso molecular dos fragmentos foi comparado ao padrão do peso molecular de 100pb, sendo considerado positivo quando amplificado um fragmento do gene PC03/PC04 de aproximadamente de 100pb. A visualização foi realizada em fotodocumentador para gel de eletroforese.

4.5 ANÁLISES DOS RESULTADOS

A análise dos resultados obtidos, por meio da análise molecular realizada no presente estudo para as amostras de tecidos e cultivo *in vitro* de *L. (L.) infantum*, foi realizada de forma descritiva. Bem como a comparação entre os resultados moleculares e os dados clínicos, parasitológicos de cultivo *in vitro* e sorológicos obtidos previamente (SPINELLI, 2018).

5. RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS

O material resultante do processo de extração das massas parasitárias utilizadas individualmente como amostras para otimização das técnicas moleculares não apresentou contaminação com RNA e proteína. Cinco delas apresentaram concentração maior de 50ng/ μ L tendo que ser ajustadas. Todas as 14 amostras de isolados de cultura de *L.(L.) infantum* (massa parasitária) apresentaram amplificação próximo ao tamanho esperado de 120pb para o alvo kDNA, com perfil semelhante ao do controle positivo, como é demonstrado na figura 10. Da mesma forma, todas as 14 amostras apresentaram amplificação para o alvo HSP70 próximo ao tamanho esperado de 234pb, com perfil semelhante ao do controle positivo, e não foram obtidas amplificações nos controles negativos de extração e PCR, conforme perfil de amplificação observado na figura 11.

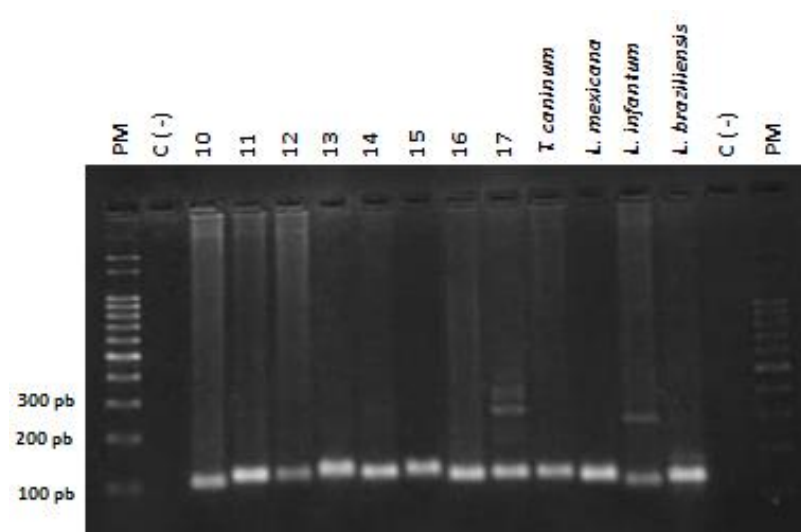


Figura 10 – Amplificações de amostras de isolados de cultura de *L. (L.) infantum* para o alvo kDNA. Revelação em gel de agarose a 2% e coradas por gel red utilizando marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb). Poço 1= PM: peso molecular (Ladder 100 PB – Ludwig Biotec); Poço 2 = C (-): controle negativo extração; Poço 3 a 10 = amostras de *L. (L.) infantum* (de 10 a 17); Poços 11 a 14: DNA de cepas controle: *Trypanosoma caninum*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) infantum* e *L.(V.) braziliensis*; Poço 15 = controle negativo reação; Poço 16 = PM.

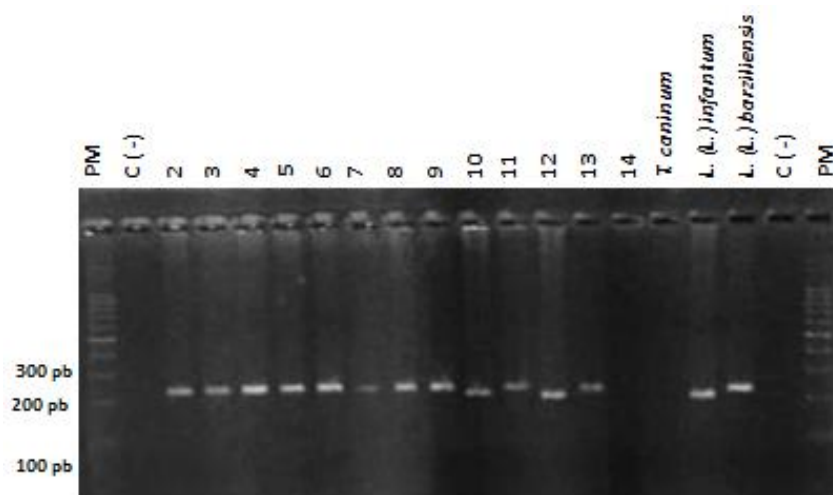


Figura 11 - Amplificações de amostras de isolados de cultura de *L. (L.) infantum* para o alvo HSP70. Eletroforese em gel de agarose a 2% corada por gel red, utilizando marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb). Poço 1= PM: peso molecular (Ladder 100 PB – Ludwig Biotec); Poço 2 = C (-): controle negativo extração; Poço 3 a 15 = amostras de *L. (L.) infantum* (de 2 a 14); Poços 16-18 = DNA de cepas controle: *Trypanosoma caninum*; *L. (L.) infantum* e *L.(V.)brasiliensis*; Poço 19 = controle reação PCR (H₂O ultrapura); Poço 20 = PM.

5.2 AMOSTRAS DE FRAGMENTOS DE PELE ÍNTEGRA

O DNA extraído a partir dos fragmentos de pele não apresentou contaminação com RNA ou proteína. Todas as 12/12 (100%) amostras testadas por PCR convencional apresentaram amplificação próxima ao tamanho esperado de 120pb para o alvo kDNA (Tabela 2), com perfil semelhante ao do controle positivo, e apenas 3/12 (25%) amostras para o tamanho esperado de 234pb para o alvo HSP70. E não foram obtidas amplificações nos controles negativos de extração e PCR.

5.3 AMOSTRAS DE ASPIRADOS DE MEDULA ÓSSEA

Não houve contaminação com RNA ou proteínas no DNA extraído a partir dos aspirados de medula óssea. A quantificação por espectrofotometria demonstrou que 9/11 amostras possuíam pouco DNA e concentração menor que a desejada (< 50 ng/uL). As 9 amostras foram submetidas à concentração seguida de uma nova quantificação e 7/9 amostras ainda apresentavam pouco DNA e, portanto, essas foram novamente concentradas e encaminhadas à técnica de PCR.

Após a reação de PCR convencional para o alvo kDNA, foi observada amplificação no tamanho esperado em 3/11 das amostras. Foi observado padrão de arraste no gel de agarose em 8/11 amostras, sendo então realizada uma diluição seriada (1:10, 1:100, 1:000) em todas as 8 amostras. As diluições foram submetidas a nova reação de PCR convencional para o alvo kDNA. Foram amplificados fragmentos de DNA próximo ao tamanho esperado de 120pb na PCR para o alvo kDNA, com perfil semelhante ao do controle positivo, em pelo menos uma diluição de todas as 11/11(100%) amostras concentradas (Tabela 2).

5.4 AMOSTRAS DE SANGUE

A avaliação da relação de pureza demonstrou que não houve contaminação com RNA ou proteína no material extraído das amostras de sangue. A PCR convencional para o alvo kDNA amplificou fragmentos de DNA próximo ao tamanho esperado de 120pb, com perfil semelhante ao do controle positivo, em 8,3% (1/12) das amostras (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da PCR para amplificação do alvo kDNA nas amostras de fragmentos de pele, aspirados de medula óssea e sangue proveniente de cães com leishmaniose visceral

Resultados da PCR para amplificação do alvo kDNA			
Animais	PCR Pele	PCR Medula	PCR Sangue
1	+	+	-
2	+	+	-
3	+	+	-
4	+	+	-
5	+	+	-
6	+	+	-
7	+	+	-
8	+	+	-
9	+	+	-
10	+	+	-
11	+	+	-
12	+	*	+

Legenda: (+): positivo, (-): negativo, (*): não possui o tecido

A PCR para o alvo PC03 e PC04 realizada como teste de inibição no sangue, amplificou fragmentos de DNA do gene da β globina na altura esperada de aproximadamente 100pb, com perfil semelhante ao do controle positivo, em 11/12 amostras (Figura 12).

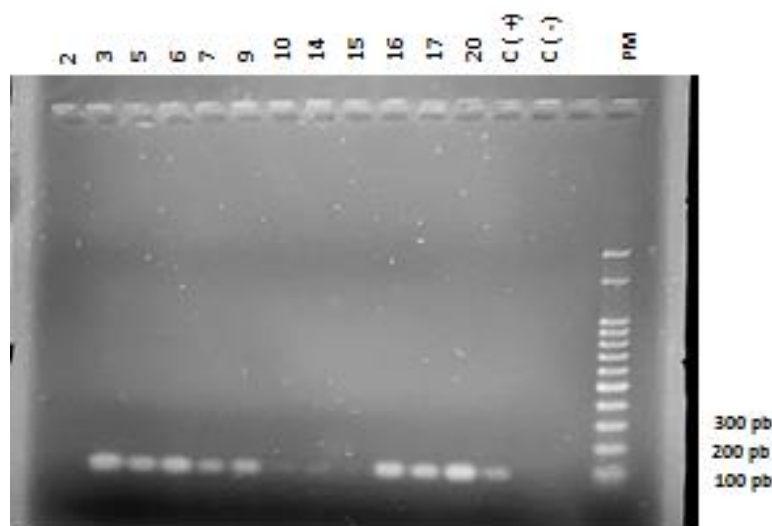


Figura 12 - Amplificações de amostras de sangue para o alvo PC03/PC04 para teste de inibição. Eletroforese em gel de agarose a 2% corada por solução de brometo de etídio a 0,5 μ g/mL, utilizando marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb). Poço 1 a 12 = amostras de sangue; Poço 13 = C (+): controle positivo; Poço 14 = C (-): controle negativo; Poço 16 = PM: peso molecular.

5.5 RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS MOLECULARES E SOROLÓGICOS

A utilização da PCR para o gene alvo kDNA como diagnóstico molecular permitiu a amplificação de fragmentos de DNA na altura esperada de 120pb em ao menos uma amostra de tecido em todos os 12 (100%) cães (Tabela 2).

Levando em consideração o critério diagnóstico atual do MS para LVC (TR-DPP® e ELISA positivos), 11/12 (91,6%) animais foram considerados positivos (Tabela 3). Desses, todos (100%) os cães amplificaram fragmentos de DNA próximo da altura esperada de 120pb, com perfil semelhante ao do controle positivo, por meio da PCR nos tecidos de pele e/ou medula e apenas 1/11 (9,9%) em amostras de sangue. O único 1/12 (8,3%) animal considerado negativo pelo diagnóstico de referência do MS apresentou amplificação próximo da altura esperada nas PCR de pele e medula, mas não na PCR de amostra de sangue (Tabela 5).

Tabela 3 – Relação dos resultados moleculares e sorológicos de acordo com o critério diagnóstico atual para LVC do MS (TR-DPP® e ELISA)

Relação dos resultados moleculares e sorológicos do critério atual (TR-DPP® e ELISA)

	PCR (+)	PCR (-)
Sorologia (+)	11	0
Sorologia (-)	1	0

Tendo como base o critério de positividade sorológico antigo do MS (ELISA e RIFI) 10/12 (83,3%) cães foram considerados positivos (Tabela 4). Desses, todos (100%) apresentaram amplificação próximo da altura esperada de 120pb, com perfil semelhante ao do controle positivo, na PCR de medula e pele e 1/10 (10%) no sangue. Dos 2/12 (16,6%) animais considerados negativos pelo critério antigo, todos (100%) apresentaram amplificação próximo da altura esperada de 120pb, com perfil semelhante ao do controle positivo, na PCR de pele e medula e nenhum na PCR de sangue (Tabela 5).

Tabela 4 – Relação dos resultados moleculares e sorológicos de acordo com o critério diagnóstico antigo para LVC do MS (ELISA e RIFI)

Relação dos resultados moleculares e sorológicos do critério antigo (ELISA e RIFI)

	PCR (+)	PCR (-)
Sorologia (+)	10	0
Sorologia (-)	2	0

Tabela 5 – Resultados da PCR para o gene alvo kDNA em amostras de tecidos de cães e diagnóstico sorológico levando-se em consideração os critérios atual e antigo do MS para diagnóstico de LVC

Resultados da PCR para o gene alvo kDNA em amostras de tecidos e diagnóstico sorológico levando em consideração os critérios atual e antigo do Ministério da Saúde para diagnóstico de LVC

Animal	PCR Pele	PCR Medula	PCR Sangue	Diag de referência MS	
				TR-DPP® e ELISA (atual)	ELISA E RIFI (antigo)
1	+	+	-	+	+
2	+	+	-	+	+
3	+	+	-	+	+
4	+	+	-	+	-
5	+	+	-	+	+
6	+	+	-	+	+
7	+	+	-	+	+
8	+	+	-	+	+
9	+	+	-	+	+
10	+	+	-	-	-
11	+	+	-	+	+
12	+	*	+	+	+

Legenda: (+): positivo, (-): negativo, (*) não possui o tecido

5.6 RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS MOLECULARES E PRESENÇA DE SINAIS CLÍNICOS CARACTERÍSTICOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Dos 12 animais inclusos no estudo, 3/12 (25%) eram assintomáticos, e todos (100%) amplificaram fragmentos de DNA próximos da altura esperada de 120pb para o alvo kDNA, com perfil semelhante ao do controle positivo, em amostras de pele e medula, e nenhum em amostras de sangue. Todos os 9/12 (75%) animais sintomáticos apresentaram amplificação de fragmentos de DNA próximo da altura esperada, com perfil semelhante ao do controle positivo, em amostras de medula e/ou pele e somente 1/9 (11,1%) no sangue (tabela 6 e 7).

Tabela 6 – Relação entre amplificação de DNA na altura esperada de 120pb na PCR para o alvo kDNA e sinais clínicos apresentados pelos cães

Relação entre amplificação de DNA na PCR para o alvo kDNA e sinais clínicos dos cães			
	PCR Pele +	PCR medula +	PCR sangue +
Assintomático (n=3)	3	3	0
Sintomático (n=9)	9	8	1

5.7 RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS MOLECULARES E OS DADOS PARASITOLÓGICOS DE CULTIVO *IN VITRO*

Dos 12 (100%) cães que apresentaram cultivo de *L. (L.) infantum* positivo para pele e/ou medula, todos amplificaram fragmentos de DNA próximos da altura esperada de 120pb por meio da PCR para o gene alvo kDNA em amostras de tecido de pele e/ou medula, com perfil semelhante ao do controle positivo, e apenas 1/12 (8,3%) em amostra de sangue. Das 11 amostras de aspirados de medula óssea que apresentaram amplificação próxima à altura esperada para o alvo kDNA na PCR, 10 (90,9%) haviam sido previamente positivos na cultura de medula. Já em relação às amostras de fragmentos de pele, dos 12 cães que apresentaram amplificação próxima à altura esperada para o alvo kDNA na PCR, 8/12 (66,6%) haviam sido previamente positivos na cultura de pele (Tabela 7).

5.8 RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS MOLECULARES E OS DADOS PARASITOLÓGICOS E SOROLÓGICOS

O emprego da PCR como diagnóstico detectou amplificação próxima da altura esperada de 120pb, com perfil semelhante ao do controle positivo, em todas (100%) as amostras de pele e medula e foi superior aos métodos sorológicos previamente utilizados para diagnóstico de *Leishmania* sp. nas amostras estudadas. Entretanto, para as amostras de sangue, a superioridade dos ensaios moleculares não foi observada, uma vez que esta técnica só foi capaz de detectar amplificação próxima da altura esperada, com perfil semelhante ao do controle positivo, em 8,3% (1/12) dos animais, enquanto a sorologia detectou 91,6% dos

animais positivos. Quando comparados aos resultados moleculares, o cultivo *in vitro* considerando-se ambos os tecidos do mesmo hospedeiro (pele e medula) teve a mesma capacidade de detecção de 100%. Entretanto, quando se comparou os dois métodos levando-se em consideração os tecidos isoladamente, a PCR utilizando o alvo kDNA apresentou maior positividade tanto para pele quanto para medula em comparação a cultura (Tabela 7).

Tabela 7 - Relação entre os resultados moleculares e os dados parasitológicos, sorológicos (considerando métodos de referência atual e antigo do Ministério da Saúde para diagnóstico de LVC) e clínicos dos cães estudados

Relação entre os resultados moleculares e os dados parasitológicos, sorológicos e clínicos dos cães								
Animal	PCR Pele	PCR Medula	PCR Sangue	Referência pelo MS		Cultura		Clínica
				TRDPP e ELISA(atual)	ELISA e RIFI(antigo)	Medula	Pele	
2	+	+	-	+	+	+	+	Sint.
3	+	+	-	+	+	C	+	Sint.
5	+	+	-	+	+	+	+	Assint.
6	+	+	-	+	-	+	+	Sint.
7	+	+	-	+	+	+	-	Sint.
9	+	+	-	+	+	+	C	Sint.
10	+	+	-	+	+	+	+	Sint.
14	+	+	-	+	+	+	-	Assint.
15	+	+	-	+	+	+	+	Sint.
16	+	+	-	-	-	+	-	Assint.
17	+	+	-	+	+	+	+	Sint.
20	+	*	+	+	+	*	+	Sint.

(+): positivo, (-): negativo, (*) não possui o tecido, (C) amostra contaminada

6. DISCUSSÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o Brasil é um dos países endêmicos para LV que mais notifica casos no mundo (WHO, 2019). Nos municípios de Niterói e Maricá, localizados na região metropolitana do Rio de Janeiro, foram notificados casos de cães domésticos soropositivos, que em sua maioria apresentam a forma assintomática da infecção, sendo um importante reservatório do parasito. Este fato é de suma importância, pois a LVC tende a preceder a LV humana, devido à presença do vetor e do reservatório na região (NITERÓI, 2015; OLIVEIRA, 2015; ABRANTES, 2016).

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com o diagnóstico da LVC utilizando testes parasitológicos, imunológicos e moleculares, no intuito de diagnosticar a doença canina e comparar a acurácia das metodologias, de forma a garantir um diagnóstico mais confiável nessa região de baixa transmissão. Em um estudo anterior foram analisadas 214 amostras de cães residentes dos municípios de Niterói e Maricá utilizando métodos parasitológicos e imunológicos. O inquérito sorológico demonstrou que 9,3% (20/214) dos cães foram positivos em ao menos um dos testes de referência do MS (TR-DPP® e ELISA) (SPINELLI, 2018). Isso evidencia a importância de estudos em áreas de baixa transmissão, especialmente para avaliar métodos diagnósticos mais eficazes, buscando prevenir a dispersão do protozoário na região para evitar a ocorrência de casos humanos.

Na região de estudo, os municípios de Niterói e Maricá, os inquéritos epidemiológicos realizados previamente por outros pesquisadores determinaram a prevalência da LVC a partir de testes parasitológicos e imunológicos (OLIVEIRA et al., 2015; ABRANTES et al., 2016; 2018). No presente estudo, realizamos o diagnóstico molecular por PCR utilizando diferentes amostras de tecidos do hospedeiro canino, que foram previamente colhidas no trabalho anteriormente citado (SPINELLI, 2018), todos os animais inclusos foram positivos no teste de triagem TR-DPP® e no cultivo *in vitro* de pele e/ou medula, cujas amostras foram caracterizadas como *L. (L.) infantum* pela técnica de isoenzimas (CUPOLILLO et. al., 1994).

No presente estudo, todos os 12 cães apresentaram amplificação próxima da altura esperada para o gene alvo kDNA, com perfil semelhante ao do controle positivo, em ao menos uma amostra de tecido testada por ensaio molecular de PCR. Houve amplificação de DNA em 12/12 fragmentos de pele (100%), 11/11 (100%) aspirados de medula óssea, e apenas 1/12

(8,3%) amostra de sangue. Essa variação deve ter ocorrido devido a diferente distribuição parasitária nos tecidos (MAIA et al., 2009). A detecção de DNA em pele e medula foi superior, devido a maior carga parasitária e foi observada semelhança na amplificação entre esses tecidos. Lara-Silva e colaboradores (2015) também demonstraram em um estudo em região de baixa transmissão através da análise molecular de 51 cães, que a positividade na PCR foi semelhante utilizando amostra de medula, com 41 (80%) cães positivos, e de pele, com 35 (69%) positivos.

No entanto, vale ressaltar, que a análise nas amostras de pele foi mais simples e rápida, pois a amplificação foi realizada em uma única reação. Por outro lado, na medula houve a necessidade de inclusão de algumas etapas (concentração e quantificação) com a finalidade de concentrar o DNA, pois mesmo submetidas à centrifugação a vácuo, as amostras apresentaram pouca concentração de DNA. O que influenciou na amplificação, sendo necessário realizar repetições na PCR, além da etapa de diluição seriada em amostras que apresentaram alta concentração de DNA. No que diz respeito ao sangue, a detecção de DNA foi inferior comparado aos demais tecidos, devido à baixa parasitemia (LOPES et al., 2017; RIBOLDI et al., 2018). Segundo Oliveira e colaboradores (2015), a detecção de amastigotas em sangue periférico é difícil por caracteriza-se um tecido de passagem, em função do parasito se instalar nos órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, como o fígado, baço, medula óssea, linfonodos e na pele. De acordo com Al-Soud & Radstrom (2001), o tecido sanguíneo contém inibidores de PCR que podem interferir na amplificação do DNA. No entanto, os resultados do teste de inibição realizado no presente estudo sugerem a possibilidade de inibição em apenas uma das 11 amostras testadas. Desta forma, sugere-se que, nas condições experimentais utilizadas no presente estudo, o sangue não foi o um bom tecido de escolha para o diagnóstico molecular de LVC nessa área de baixa transmissão.

Lopes e colaboradores (2020), em estudo epidemiológico, utilizaram a PCR em amostras de cães soropositivos e residentes de área de recente transmissão de LV, no estado de Minas Gerais, para confirmar a infecção por *L. (L.) infantum*. O diagnóstico molecular foi realizado em 60 amostras de tecidos de cães, que apresentaram semelhantes valores na amplificação de 96,6% na medula, 95% na pele e nos linfonodo e 98,3% no baço. Os resultados encontrados por essa pesquisa relacionados à semelhança na amplificação de medula e pele corroboram com os resultados do nosso estudo. No entanto, esses autores sugeriram que a pele é o melhor tecido de escolha para realizar o diagnóstico molecular da

LVC. Os fragmentos de pele íntegra podem ser utilizados em substituição aos demais tecidos citados, por caracterizarem-se como uma amostra de fácil obtenção e que demanda uma técnica menos invasiva para sua coleta (LOPES et al., 2020). Nesse contexto, Laurenti e colaboradores (2013) relataram que a detecção de parasitos de *L. (L.) infantum* e seu DNA, podem ser realizados em pele hígida, sem a presença de lesões características de LVC. De modo que, a obtenção deste tecido se torna mais fácil e simples, já que a coleta pode ser realizada em pele íntegra, sendo menos invasiva, não colaborando para piora clínica do animal que muitas vezes pode estar debilitado.

Em recente estudo, Chagas e colaboradores (2021) enfatizam que a pele foi a melhor opção para o diagnóstico molecular da infecção por *L. (L.) infantum* em cães com diferentes estados clínicos. Este resultado difere do relatado em nosso estudo, no qual, a PCR de pele e medula apresenta o mesmo desempenho diagnóstico. Esses autores avaliaram a carga parasitária nos tecidos de pele, medula óssea, *swab* de conjuntiva e linfonodo de 65 cães infectados, utilizando a qPCR para o alvo kDNA. As análises dos resultados mostraram que a pele foi o tecido com maior carga parasitária e as amostras apresentaram maior positividade na qPCR com variações de 0.10 a 97.6×10^7 , seguida pelas punções de linfonodo poplíteo de 0.007 a 28.8×10^5 e medula óssea de 0.059 a 64.2×10^4 , e as amostras de esfregaço conjuntival com as cargas mais baixas de 0.001 a 12.3×10^3 .

Borja e colaboradores (2016) realizaram estudo em uma região endêmica localizada no estado da Bahia, em que foram utilizadas amostras de sangue, aspirado esplênico e biópsias de pele de 23 cães. Para determinar a carga parasitaria, foi realizada a qPCR utilizando como alvo molecular uma região conservada de 120pb do DNA do minicírculo do cinetoplasto do parasito. Todos os cães testaram positivo por qPCR em relação a pelo menos um dos tipos de tecido avaliados, incluindo 78,2% na pele, 78,2% no baço e 35% em amostras de sangue. Em comparação aos resultados obtidos em nosso estudo, executado em área não endêmica e utilizando o mesmo alvo molecular, foi relatado em comum uma maior positividade nas amostras de pele em comparação ao sangue. Além disso, no trabalho supracitado, foi determinada uma maior carga parasitária no tecido da pele, em comparação ao sangue (BORJA et al., 2016). Isto demonstra que, tanto em áreas endêmicas como em áreas de baixa transmissão, uma maior carga parasitária no tecido de cães está relacionada a um melhor desempenho no diagnóstico molecular.

Os resultados encontrados demonstraram que a PCR utilizando como alvo molecular o kDNA obteve melhor desempenho diagnóstico que o alvo molecular HSP70, uma vez que este foi amplificado em apenas 3/12 (25%) amostras de pele de cães infectados. A reação utilizando como alvo o HSP70, apresentou baixo rendimento na pele, que é um tecido que comumente apresenta elevada carga parasitária (CHAGAS et al., 2021). Mesmo diante destes resultados obtidos por nós, convém lembrar que mais testes seriam necessários e devem ser realizados, já que infelizmente devido a emergência da pandemia, não foi possível dar continuidade aos experimentos relacionados a otimização do HSP70 nem com a pele (repetir os experimentos iniciais) nem com os outros dois tecidos (medula óssea e sangue periférico) utilizados neste estudo. Esse menor rendimento encontrado na pele, pode ter sido observado em razão do kDNA se encontrar em uma região conservada do minicírculo do cinetoplasto do parasito, em múltiplas cópias e estima-se que o alvo apresente maior sensibilidade na reação, em contraste ao HSP70 que apresenta de 10 a 15 cópias conservadas, variando entre as espécies (MaC FARLANE et al., 1990).

Em estudo desenvolvido por Graça e colaboradores (2012) a PCR HSP70 foi realizada juntamente a técnica de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (HSP70 PCR-RFLP) para caracterizar as espécies de *Leishmania*, além do emprego da PCR com o alvo kDNA. Os autores observaram uma sensibilidade similar entre os dois alvos, de aproximadamente 81% para o kDNA e de 72% na HSP70, o que difere do resultado do nosso estudo, no qual o desempenho da PCR utilizando o alvo kDNA foi superior ao HSP70. Nesse contexto, Santos e colaboradores (2018) observaram em comum, um melhor desempenho utilizando o alvo kDNA (66%), em comparação ao HSP70 (50%). Esses autores realizaram uma padronização na PCR, no qual observaram que amostras com aproximadamente 30 ng/ μ L de DNA apresentavam boa amplificação utilizando a HSP70 e estariam aptas para visualização de bandas na revelação do gel de agarose (SANTOS, 2018). Contudo, em relação ao nosso estudo, esta pode ter sido uma das razões pelo qual a aplicação da PCR HSP70 não foi satisfatória, pois as amostras de tecidos apresentaram baixa concentração de DNA do parasito, algumas amostras com menos de 30 ng/ μ L. Os dados apresentados acima, reforçam que serão necessários mais experimentos para a otimização da PCR utilizando o alvo HSP70 na pele e nos outros tecidos disponíveis (medula óssea e sangue periférico).

Através da análise dos resultados, foi observado que o emprego do alvo kDNA (120pb) na PCR, amplificou fragmentos de DNA de aproximadamente 120pb de região

conservada do cinetoplasto de um isolado de cultura de *Trypanosoma caninum*, que foi utilizado como controle de reação. Este achado foi uma surpresa para o nosso grupo de pesquisa, uma vez que não foi anteriormente descrito. De acordo com dados da literatura, o kDNA 120pb é um alvo molecular gênero específico e amplifica apenas o kDNA em espécies de *Leishmania* (ROGERS et al., 1990). Além disso, os alvos baseados no kDNA de espécies de *Trypanosoma*, comumente amplificam aproximadamente 330pb de região variante do DNA do cinetoplasto desses protozoários (BARROS, 2013). Vale ressaltar, que foi observada uma semelhança no desenho dos oligonucleotídeos iniciadores baseados no kDNA de *Leishmania* sp. (utilizado neste estudo) e iniciador utilizado por Madeira e colaboradores (2009), que é utilizado para amplificação de kDNA em *T. caninum*, o que pode explicar este achado, pois há semelhança genética entre as espécies de tripanossomatídeos (Família Trypanosomatidae) (MADEIRA et al., 2009).

Neste sentido, em nossa região de estudo, os municípios de Niterói e Maricá, regiões de baixa transmissão de LV, já foram reportados casos de infecção canina por *Trypanosoma caninum* (BARROS et. al., 2012), o que indica a coexistência entre os dois agentes, sendo necessária a utilização de técnicas aprimoradas para a diferenciação entre as espécies (PINTO et. al., 2014). Nesse contexto, os dados clínicos e os resultados obtidos com as diferentes metodologias de diagnóstico previamente realizadas (SPINELLI, 2018), e o diagnóstico molecular, executado no presente estudo, sugerem infecção por *Leishmania (L.) infantum* nesses animais. Pois, todas as amostras foram previamente submetidas à caracterização por isoenzimas e foi confirmada a espécie *Leishmania (L.) infantum*. Além disso, através do diagnóstico molecular a PCR amplificou fragmentos de DNA em todas as amostras de aspirados de medula e em uma amostra de sangue, por outro lado, o isolamento de *T. caninum*, tem sido feito unicamente a partir do cultivo da pele íntegra de cães, com frustrantes tentativas de isolamento em outros tecidos (MADEIRA et. al., 2009; PINTO et. al., 2010; SILVA et. al., 2011). Este achado não estava entre os nossos objetivos, e são necessárias mais investigações no futuro. É importante ressaltar, que há interesse em dar continuidade as análises e realizar o sequenciamento nucleotídico de todas as amostras para confirmar a infecção por *L. (L.) infantum* através de métodos moleculares.

No que diz respeito à comparação dos diagnósticos molecular e sorológico, a partir de dados coletados por Spinelli (2018), dos 12 cães do presente estudo, 11 (91,6%) foram positivos e 1 (8,3%) obteve resultado negativo de acordo com os métodos de referência do

MS (TRDPP® e ELISA). No entanto, levando em consideração os testes de referência antigos do MS (ELISA e RIFI), 10 (83,3%) cães foram considerados positivos e 2 (16,6%) negativos. A partir dos resultados encontrados em nossa pesquisa, foi possível realizar a confirmação de infecção por *Leishmania* sp. em um cão considerado negativo pelo critério diagnóstico atual recomendado pelo MS e em dois cães negativos pelo critério antigo. Uma superior capacidade de detecção de cães infectados utilizando o diagnóstico molecular em comparação à sorologia também foi observado por Riboldi e colaboradores (2018), em um estudo em uma região não endêmica de LV no estado de Porto Alegre, onde foram avaliadas 405 amostras de soro de cães pelos métodos sorológicos preconizados, das quais 21 foram positivas em ao menos um teste e foram submetidas para confirmação dos casos utilizando qPCR kDNA. O emprego do método molecular identificou a infecção por *Leishmania* sp. somente em 16 (76,2%) cães. No entanto, levando em consideração apenas o protocolo atual do MS (TR-DPP® e ELISA), apenas 2 (0,5%) amostras seriam consideradas positivas para LVC. Em relação à análise molecular, os resultados do nosso trabalho se diferenciam dos dados do artigo citado, pois em nosso estudo, a PCR utilizando o mesmo alvo molecular, apresentou maior positividade e foi capaz de confirmar a infecção de todos os 12 (100%) cães com resultados positivos ou negativos na sorologia. A maior positividade em nosso estudo se atribui as amostras utilizadas, que apresentam uma maior carga parasitária em relação ao soro, utilizado por Riboldi e colaboradores (2018).

Vale ressaltar ainda, que esses autores utilizaram como diagnóstico complementar métodos parasitológicos de cultura *in vitro* e citologia, e nenhuma destas metodologias foi capaz de identificar nenhum dos cães infectados que foram considerados sorologicamente positivos (RIBOLDI et al., 2018). Entretanto, em nosso estudo, as amostras inclusas também foram avaliadas previamente por diagnóstico parasitológico (SPINELLI, 2018) e através do cultivo *in vitro*, onde os parasitos foram encontrados em pelo menos uma das amostras em todos os 12 cães positivos nos ensaios moleculares.

Boechat e colaboradores (2020) realizaram um estudo descritivo entre agosto de 2015 e dezembro de 2016, onde foram analisadas amostras de 70 cães provenientes de uma região endêmica para LVC no estado do Rio de Janeiro e através dos resultados foi observado melhor desempenho no diagnóstico molecular em relação ao parasitológico, pois o DNA de *Leishmania* sp. foi amplificado a partir da qPCR em todos os 23 cães considerados negativos pelo cultivo *in vitro*. Em nosso estudo, o diagnóstico molecular obteve mesmo desempenho

diagnóstico que os métodos parasitológicos de cultivo *in vitro* quando se levou em consideração a positividade em todos os tecidos analisados, essa distinção pode ter ocorrido, pois o critério de inclusão neste estudo levou em consideração amostras positivas no teste parasitológico. Entretanto, quando se comparou a capacidade de detecção do DNA em pele íntegra e medula óssea, em relação ao cultivo *in vitro* nesses mesmos tecidos, foi observado que a PCR utilizando o alvo kDNA foi capaz de detectar uma maior positividade, corroborando com os dados de Boechat e colaboradores (2020). Caldas e colaboradores (2020) em uma pesquisa desenvolvida em uma região endêmica do estado de Minas Gerais, observaram concordância entre a sensibilidade da qPCR e os métodos parasitológicos direto e de cultivo *in vitro*, que variou entre 66,67 a 86,67%, em amostras de medula óssea, linfonodo poplíteo e *swab* de conjuntiva de cães. Vale ressaltar, que no estudo citado, os métodos parasitológicos foram considerados padrão ouro para o diagnóstico final dos cães e a qPCR foi realizada somente em cães positivos no exame parasitológico direto e no cultivo *in vitro*, o que pode ter levado a essa distinção em comparação aos exames diagnósticos (CALDAS et al., 2020). Em contrapartida, os dados da literatura apontam sensibilidade superior aos métodos moleculares (da COSTA LIMA et al. 2013; GHASEMIAN et al. 2016; HOSSAIN et al. 2017).

Analisando os nossos resultados, foi possível identificar um cão infectado, clinicamente assintomático, que foi considerado negativo pelos métodos sorológicos (considerando os critérios atual e antigo do MS). No entanto, através da PCR, foram amplificados fragmentos de DNA na altura esperada de 120pb a partir das amostras de pele e medula. Isto demonstra que os métodos sorológicos citados não foram capazes de determinar a infecção nesse caso, o que confirma a necessidade da utilização de mais de uma metodologia diagnóstica para a confirmação da LVC, principalmente em áreas de baixa transmissão. Vale ressaltar, que todos os 12 cães estudados apresentaram positividade no teste de triagem TR-DPP®, mas nem todos foram positivos no teste confirmatório do ELISA. Com isso, baseados em nossos resultados, podemos sugerir que quando o resultado da sorologia for positivo em ao menos um teste de referência, a PCR pode ser utilizada como método complementar para a confirmação do diagnóstico da LVC. Desta forma, evitando que animais positivos não sejam diagnosticados e continuem como reservatórios, infectando o vetor flebotomíneo e mantendo o ciclo parasitário na região.

Em estudo observacional desenvolvido no estado de Minas Gerais, Rocha e colaboradores (2020) analisaram um total de 6.667 amostras de cães por inquérito sorológico utilizando TR-DPP® e ELISA. As análises foram semestrais, e ao fim do estudo 8,5% dos cães foram sorologicamente positivos para LVC e 9,6% apresentaram sorologia negativa no primeiro teste, sendo acompanhados por consecutivos testes sorológicos para avaliar a soroconversão. No entanto, na maioria dos estudos epidemiológicos e de vigilância de LVC não é possível a repetição da sorologia, pois a análise dos cães é pontual. Segundo Peixoto e colaboradores (2015), a utilização dos métodos sorológicos de referência apresenta eficácia moderada para o diagnóstico de LVC, pois a sensibilidade desses métodos é reduzida em amostras de cães assintomáticos (ROMERO E BOELAERT, 2010). Estes achados corroboram com os resultados observados por Spinelli (2018), no qual o diagnóstico de referência apresentou maior positividade no grupo de animais com sinais clínicos 14 (70%) em comparação aos assintomáticos 6 (30%).

Nesse contexto, Caldas e colaboradores (2020) relataram que o desempenho do diagnóstico molecular é superior em amostras de cães sintomáticos, pois em seus resultados, foi observado que a qPCR apresentou uma alta porcentagem de animais com resultado falso negativo em amostras de cães assintomáticos. Por outro lado, de Carvalho e colaboradores (2018), determinaram que os testes sorológicos, apresentam baixa sensibilidade em animais assintomáticos, já a PCR demonstra maior homogeneidade para diagnosticar LVC independente da condição clínica do cão. O que corrobora com os resultados obtidos em nosso estudo, no qual o emprego da PCR identificou a infecção em todos os cães, em ao menos um dos tecidos analisados, independente do quadro clínico. De acordo com um estudo realizado por Carvalho Junior e colaboradores (2017) utilizando amostras de pele de orelha e da região genital de cães machos soropositivos e provenientes do estado de Minas Gerais, através do emprego da PCR, foi detectado um alto parasitismo nestes tecidos, que foi superior no grupo de cães com sinais clínicos em comparação aos cães assintomáticos. Chagas e colaboradores (2021) realizaram uma investigação utilizando a qPCR como diagnóstico molecular em amostras de pele, medula óssea, linfonodo poplíteo e em amostras de *swab* de conjuntiva de cães, no qual foi observado que a carga parasitária nesses tecidos varia conforme a apresentação clínica dos cães, no qual quanto maior a intensidade da manifestação clínica, maior a carga parasitária nos tecidos.

Embora tecnicamente mais vantajosos, conforme observado em nossos resultados, os métodos moleculares ainda não são uma realidade aplicável a todos os laboratórios de pesquisa, em um contexto de inquérito epidemiológico, para o diagnóstico da LVC (LOPES, 2017). Pois, financeiramente esses métodos demandam elevados custos para sua execução, reagentes caros, equipamentos específicos de laboratório especializado em biologia molecular e pessoal treinado para sua realização (TRAVI et. al., 2018). Em contrapartida, os métodos imunológicos padronizados pelo MS, são de custo mais acessível, rápida execução e reprodutibilidade em campo (BRASIL, 2011). Entretanto, em áreas de baixa transmissão o emprego singular dessa metodologia pode culminar na liberação de resultados falsos negativos e a permanência de reservatórios infectados no ambiente. E como consequência da dispersão do protozoário na região, há o aumento da notificação de casos de LVC que tende a preceder a ocorrência de casos humanos de LV (BELO, et. al., 2013).

Contudo, os achados incluídos no presente estudo, demonstraram que as amostras de pele e medula apresentaram semelhante amplificação, e superior positividade em comparação as amostras de sangue. Pois, o sangue não é o tecido de escolha para realizar o diagnóstico molecular da LVC, por conta da baixa parasitemia. Por outro lado, a sorologia apresenta um bom desempenho quando se utiliza amostras de sangue, devido às elevadas taxas de anticorpos presentes no tecido durante a infecção por *L. (L.) infantum* (COURTENAY et al., 2002). A relação entre o diagnóstico molecular e os dados clínicos, sorológicos e parasitológicos prévios, demonstrou que a PCR foi o método mais eficiente para diagnosticar a LVC nesse grupo de animais trabalhados para esta área de baixa transmissão, independente da condição clínica do cão. Além disso, o alvo molecular que amplifica a região do cinetoplasto do parasito apresentou melhor desempenho diagnóstico em comparação ao HSP70, o que pode ter ocorrido devido à baixa concentração de DNA do parasito encontrado nos tecidos dos cães inclusos no estudo.

7. CONCLUSÕES

- Foi possível detectar amplificação de DNA próximo à altura esperada de 120pb por meio da PCR para o alvo molecular kDNA, com perfil semelhante ao do controle positivo, em ao menos uma amostra de tecido analisada (pele, medula óssea e sangue) em todos os 12 (100%) cães infectados por *Leishmania (L.) infantum* inclusos no estudo;
- A capacidade de detecção de DNA por meio da PCR para o alvo molecular kDNA foi semelhante em amostras de pele íntegra e aspirados de medula óssea, apresentando os melhores resultados em comparação as amostras de sangue periférico;
- A PCR para o alvo molecular kDNA mostrou melhor desempenho diagnóstico em comparação ao alvo molecular HSP70 em amostras de pele íntegra de cães com leishmaniose visceral;
- A PCR para o alvo kDNA apresentou o mesmo desempenho na detecção de DNA em comparação ao cultivo *in vitro* quando se levou em consideração a positividade em todos os tecidos analisados;
- A PCR para o alvo kDNA apresentou um desempenho superior em comparação ao cultivo *in vitro* quando se levou em consideração a capacidade detecção do DNA em cada tecido estudado (pele íntegra e medula óssea);
- A PCR para o alvo kDNA apresentou desempenho superior aos métodos sorológicos (critério atual e antigo preconizado pelo MS) na detecção de positividade para LVC;
- A PCR para o alvo molecular kDNA foi capaz de detectar amplificação de DNA na altura próxima à esperada no animal considerado negativo nos métodos sorológicos (protocolo diagnóstico atual e antigo do MS);
- A PCR utilizando como alvo molecular o kDNA foi capaz de detectar amplificação de DNA na altura próxima à esperada independente da sintomatologia clínica canina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrantes TR, Madeira MF, Silva DA, Perié CSF, Mendes Júnior AA, Menezes RC, et al. Identification of canine visceral leishmaniasis in a previously unaffected area by conventional diagnostic techniques and cellblock fixation. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2016; v.58, n. 3.

Abrantes TR, Werneck GL, Almeida AS, Figueiredo FB. Fatores ambientais associados à ocorrência de leishmaniose visceral canina em uma área de recente introdução da doença no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2018; v. 34, n. 1, e00021117.

Aebischer T. Recurrent cutaneous leishmaniasis: A role for persistent parasites? *Parasitology Today*. 1994; v.10, p.25-28.

Aguiar GM & Medeiros WM. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil 2003; p.207- 255. In Rangel EF & Lainson R (org.), *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 368 pp.

Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med*. 2017 Oct; 57:1-29.

Akhoundi M, Hajjarian H, Baghaei A, Mohebbali M, Geographical distribution of leishmania species of human cutaneous leishmaniasis in Fars province, southern Iran. *Iran. J. Parasitol*. 8, 85e91, 2013.

Alencar, J. E. Leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Med. Univ. Fed. Ceará*, 17/18: 129-48, 1977/78.

Alencar, J. E. Calazar canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil Fortaleza, Imp. Oficial, 1959. (Tese da Universidade Federal do Ceará).

Al-soud WA & Radstrom P, Purificação e caracterização de componentes inibidores de PCR em células sanguíneas. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39 (2), 485–493.

Altamirano-enciso AJ, Marzochi MCA, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KBF. On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post- colombian historical source. *História, Ciências, Saúde—Manguinhos*. 2003; 10(3), 852–882.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Den Boer M. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.

Alves WA, & Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cadernos de Saúde Pública* [online]. 2004, v. 20, n. 1. pp. 259-265.

Andrade-Filho JD, Scholte RGC, Amaral ALG, Shimabukuro PHF, Carvalho OS, Caldeira RL. Occurrence and Probability Maps of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *J Med Entomol*. 2017 Sep 1;54(5):1430-1434.

Arbeláez N, Moreno J, Murillo J, Montoya A, Robledo SM, Vélez A, Vélez ID, First Report of an Urban Case of Canine Visceral Leishmaniasis in the Municipality of Cali, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2020; Feb;102(2):289-293.

Ashford RW, The leishmaniasis. In: PALMER, S.R. et al. *Zoonoses*. Oxford: Oxford University, Cap.43, p.527543, 1998.

Barros JHS, Almeida ABPF, Figueiredo FB, Sousa VRF, Fagundes A, Pinto AGS, et al. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012; 106: 419-423.

Barros, JHS. *Trypanosoma caninum*, estudo com isolados de diferentes regiões brasileiras: abordagem molecular e morfológica. Rio de Janeiro, 2013. 86 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

Barrouin-melo SM, Laranjeira DF, Filho FAA, Trigo J, Julião FS, Franke CR et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis. 2006; A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *The Veterinary Journal*. v.171, p. 331-339.

Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS Simões TC, Nascimento BWL et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(4): e2182.

BenchimoL JLG, Barreto FC, Santos DC, Pinheiro LA. Leishmanioses: sua configuração histórica no Brasil com ênfase na doença visceral nos anos 1930 a 1960. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas*.2019; Belém, v. 14, n. 2, p. 611-626, maio-ago.

Bezerra-Vasconcelos DR, Melo LM, Albuquerque E S, Luciano MCS, bevilacqua CML. Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: Screening of target genes and assessment of quantitative methods. *Experimental Parasitology*. 2011; 129: 234–239.

BIO-Manguinhos. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnóstico. IFI - Leishmaniose Visceral Canina. Imunofluorescência Indireta para diagnóstico de leishmaniose visceral canina. BIO-MANGUINHOS, Rio de Janeiro, 2008.

Boechat VC, Pereira AS, Junior AAVM, Dos Santos AS, Miranda LDFC, Figueiredo FB, et al. Frequency, active infection and load of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract of male and female dogs. PLoS ONE. 2020; 15(9): e0238188.

Borja LS, Sousa OM F, Solcà MDS, Bastos LA, Bordoni M, Magalhães JT, Laranjeira D. F, Barrouin-melo SM, et al. A carga parasitária no sangue e na pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* está correlacionada com sua capacidade de infectar vetores de flebotômicos. Vet Parasitol. 15 de outubro de 2016; 229: 110-117.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV. Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Guia de Bolso Leishmaniose Visceral, Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária – 1. ed., – Brasília - DF: CFMV, 2020. 194 p.: il.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de bolso/ Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2010; 8. ed. rev. – Brasília: Ministério da Saúde.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p.: il.

Brito CFP & Pereira DP, Diagnóstico molecular da *Leishmania* spp. em flebotomos provenientes de áreas de ocorrência de leishmanioses. In Fátima Conceição, Carlos Roberto Alves. Leishmanioses do Continente Americano. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz. 2014. 217-231.

Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. Cell. 2006; 125(3): 443-451.

Caldas S, Marcelino AP, Faria G, De Oliveira Silva F, Ataíde ACZ, Cunha LM, et al. Visceral leishmaniasis: a practical strategy for quantitative molecular diagnosis in naturally infected dogs. Parasitol Res. 2020 May; 119(5):1683-1690.

Carvalho Junior CG, Teixeira Neto RG, Lopes VV, Belo VS, Alves NR, De Paula, TB Ribeiro, et al. Parasitism and inflammation in ear skin and in genital tissues of symptomatic and asymptomatic male dogs with visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2017 Mar; 116(3):987-995.

Castro SV, Lobo CH, Figueiredo JR, Rodrigues APR. Proteínas de choque térmico HSP70: Estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. *Acta Veterinaria Brasilica.* 2013 ; v.7, n.4, p261-271,.

Cavalcanti A, Lobo R, Cupolillo E, Bustamante F, Porrozzi R. Canine cutaneous leishmaniasis caused by neotropical *Leishmania infantum* despite of systemic disease: A case report. *Parasitol Int.* 2012 Dec;61(4):738-40.

Chagas ÚMR, De Avelar DM, Marcelino AP, Paz GF, Gontijo CMF. Correlations between tissue parasite load and common clinical signs in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 2021 Mar;291:109368.

Coura JR, *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.* 2^a. Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan; 2013 – 56 Leishmaniose tegumentar americana (p.746-760).

Coura-Vital, et al. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. *The Veterinary Journal, London.* 2011; v. 190.

Coura-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt BM, Aguiar-Soares RDDO, et al. Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 5(8): e1291.

Coura-Vital W, Reis AB, Reis LE, Braga SL, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, et al . Canine visceral leishmaniasis: incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. *Vet Parasitol.* 2013; Nov 8;197(3-4):411-7.

Courtenay O, Quinnell RJ , Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis.* 2002; v. 186, p.1314-1320,

Cunha AM & Chagas E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem: *Leishmania chagasi* n.sp. Nota prévia. *Hospital (Rio J)* 1937;11:3-9.

Cupolillo E, Grimaldi G, Momen HA. general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hy.*1994; v.50, p.296-311.

Da Costa Lima MS, Zorzenon DCR, Dorval MEC, et al. Sensitivity of PCR and real-time PCR for the diagnosis of human visceral leishmaniasis using peripheral blood. *Asian Pacific J Trop Dis.* 2013; 3: 10–15.

Dantas-Torres F, Miró G, Baneth G, Bourdeau P, Breitschwerdt E, Capelli G, et al. Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health. *Emerg Infect Dis*. 2019 Dec;25(12):1-4.

Dantas-Torres F, Miró G, Bowman DD, Gradoni L, Otranto D. Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. *Trends Parasitol*. 2019; Feb;35(2):97-101.

David CV & Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*; 2009. 22(6), 491–502.

De Andrade HM, Reis AB, Dos Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, et al. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol*. 2006; 140: 231–238. 15.

De Carvalho FLN, Riboldi EO, Bello GL, Ramos RR, Barcellos RB, GEHLEN M, et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. *Epidemiology and Infection* . 2018; 146, 571–576.

De Moraes CG, Castro Lima AK, Terra R Dos Santos RF, Da-Silva, AS, Dutra PM. The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:324915.

De Paula CC, Figueiredo FB, Menezes RC, Mouta-Confort E, Bogio A Madeira MD F. Leishmaniose visceral canina em Maricá, Estado do Rio de Janeiro: Relato do primeiro caso autóctone. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2009; 42(1), 77–78.

De Souza W, Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2008; v.103, n.4, p.313-325,

De Souza NA, Brazil RP, Araki AS. The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: *Phlebotominae*) species complex. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2017; 112(3), 161–174.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89:463-9.

Dias F, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (*Psychodidae*, *Phlebotominae*). *Cadernos de Saúde Pública*, 2003; 19(5), 1373–1380.

Di Pietro S, Crinò C, Falcone A, Crupi R, Francaviglia F, Vitale F, Giudice E. Parasitemia and its daily variation in canine leishmaniasis. *Parasitol Res*. 2020 Oct;119(10):3541-3548.

Duarte MC, et al. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* [online]. 2016, v. 49, n. 04 , pp. 398-407.

Faria AR & Andrade HM, Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Rev Pan-Amaz Saude*. jun. 2012; v. 3, n. 2, p. 47-57.

Ferrer L, Rabanal RM, Domingo M Ramos JÁ, Fondevila D. Identification os *Leishmania dovani* amastigotes in canine tissues by imunoperoxidase staining. *Research in Veterinary Science*. 1988; v. 44, n. 2, p. 194-196.

Figueiredo FB, Vasconcelos TCB, De Madeira MF, Menezes RC, Maia-Elkhoury ANS Marcelino AP Werneck GL. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2018; 113(11), e180260.

Figueiredo, F. B, et al . Relato de caso autóctone de leishmaniose visceral canina na zona sul do município do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba , v. 43, n. 1, p. 98-99, Feb. 2010.

Fuzari AA, Delmondes AF, Barbosa VA, Marra FA, Brazil RP. Presence of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in the Parque Estadual da Serra da Tiririca, State of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016 Sep-Oct;49(5):616-619.

GALATI EAB. Morfologia e taxonomia: morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In: Rangel, E.F. & Lainson, R. (Orgs.). *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz Rio de Janeiro. 2003, p. 53-175.

GÁLVEZ R, MONTOYA A, FONTAL F, MARTÍNEZ ML, MIRÓ G, Controlling phlebotomine sand flies to prevent canine *Leishmania infantum* infection: a case of knowing your enemy. *Res Vet Sci*. 2018; 121:94–103.

Ghasemian M, Gharavi MJ, Akhlaghi L, Mohebbi M, Meamar AR Aryan E, Oormazdi, GZ. SYBR green-based detection of *Leishmania infantum* DNA using peripheral blood samples. *J Parasit* 2016 Dis 40:81–87.

Graça GC, Volpini AC, Romero GAS, Neto MPO, Hueb M, Porrozzi R, et al. Development and validation of PCR- based for diagnosis of American cutaneous Leishmaniasis and identification of the parasite species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2012; Vol. 107(5): 664-674, agosto.

Gradoni L, Gramiccia M, Leishmaniosis. In: *OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*. Paris: Office International des Epizooties, 2008 v.1, p.240-250.

Grima MZ. La Leishmaniosis canina. 1ª Parte. Paranorâmica general de la enfermedad. *Inf. Vet. Revista oficial del consejo general de colégios veterinários de Espanha*, p. 14 – 18, 2005.

Grimaldi GJR, Teva A, Ferreira AL, Santo SCB, Pinto IS, Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (TR-DPP CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106(1): 54-59.

Guerbouj S, Djilani F, Bettaieb J, Lambson B, Diouani MF, et al. Evaluation of a gp63 PCR based assay as a molecular diagnosis tool in canine leishmaniasis in Tunisia. *PLoS ONE* 9: e105419, 2014.

Herrera G, Castillo A, Ayala MS, Flórez C, Cantillo-Barraza O, Ramirez JD. Evaluation of four rapid diagnostic tests for canine and human visceral Leishmaniasis in Colombia. *BMC Infect Dis.* 2019 Aug 27;19(1):747.

Hossain F, Ghosh P, Khan MAA, Duthie MS, Vallur AC, Picone A, Howard RF, Reed SG, Mondal D. Real-time PCR in detection and quantitation of *Leishmania donovani* for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment. *PLoS One.* 2017 Sep 28;12(9):e0185606.

Killick-Kendrick R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. *Bulletin de la Soci.& de Pathologie Exotique*,1985; 78, 747-755.

Kocher A, Valière S, Bañuls AL, Murienne J. Sequenciamento de alto rendimento de amplicons de kDNA para a análise de minicírculos de *Leishmania* e identificação de espécies neotropicais. *Parasitologia.* Abril de 2018; 145 (5): 585-594.

Kregel K. Molecular Biology of Thermoregulation Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology.* ,2002; 92(5): 2177–86 .

Lainson R & Shaw JJ. Uma breve história do gênero *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) nas Américas, com referência particular ao Brasil amazônico. *Ciência e Cultura*, 1992; 44 : 94-106.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Trans R Soc Trop Med*, 1987; Hyg 81: 517.

Lainson R, Dye C, Shaw JJ, Macdonald DW, Courtenay O, Souza AAA, et al. Leishmaniose visceral amazônica - distribuição do vetor *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) em relação à raposa *Cercyon thirty* (Linn) e a eficiência desse reservatório hospedeiro como fonte de infecção. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Março de 1990; 85 (1): 135-137.

Lainson R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Rev Pan-Amaz Saude Ananindeua* 2010; v. 1, n. 2, p. 13-32, jun.

Lamothe J, Gaudray CH, Zarka P. Diagnostic de la leishmaniose canine. *Prat Med Chir Anim Comp.*2004; v.39, p.41-46.

Lara-Silva FDEO, Michalsky EM.; Fortes-Dias CL.; Fiuza, VDEO, Pessanha, JE, Regina-Silva, S. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.* 2015 Aug;148:128-36.

Laurenti MD, Rossi CN, Da Matta VL, Tomokane, TY, Corbett CE, Secundino NFM. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol.* 2013 Sep 23;196(3-4):296-300.

Laurenti MD. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na Leishmaniose visceral americana canina. BEPA, *Boletim Epidemiológico Paulista.*, v. 6, n. 67, 2009.

Lehninger L. Principles of Biochemistry. W. H. Freeman & Co,2004; 4 ed., pp. 1100.

Lopes EG, Sevá AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB, Hiramoto RM, Ferreira HL. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. *Epidemiol Infect.* 2017 Sep;145(12):2436-2444.

Lopes JV, Michalsky ÉM, Pereira NCL, Paula AJV, Souza AGM, Pinheiro LC, et al. Canine visceral leishmaniasis in area with recent *Leishmania* transmission: prevalence, diagnosis, and molecular identification of the infecting species. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020 Sep 11;53:e20200141.

Lukes J, Guilbride DL, Voty J, Zikova A, Benne R, Englund PT. MINIREVIEW Kinetoplast DNA Network : Evolution of an Improbable Structure. *I*(4), 495–502, 2002.

Lutz A & Neiva A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Mem. Inst. O. Cruz,* 1912 ;4:84-95.

Macfarlane J, blaxter ML, Bishop RP, Miles MA, Kelly JM. Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. *European Journal of Biochemistry,*1990; 190(2), 377–384.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Pereira AS, Figueiredo FB, et al. *Post mortem* parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol.*2006 ; v.138, p.366–370.

Madeira MF, Sousa MA, Barros JH, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A, et al. *Trypanosoma caninum* n sp (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol.* 2009; 136: 411-423.

Mohammadi M, Sharifi I, Keshavarz H. Seroepidemiology of visceral leishmaniasis in children under 12 years of age in nomads of Jiroft district using indirect immunoabsorbent assay, 2001. 4th National Iranian Congress of Parasitology and Parasitic Diseases Oct 13–16, 2003 Mashhad, Iran.

Maia C & Campino L, Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 2008 Dec;158(4):274-87.

Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Veterinary journal*, 2009; (London, England : 1997), v. 179, n. 1, p. 142–4.

Marzochi MCA. Visceral leishmaniasis in Southern Rio de Janeiro State and the risk of propagation to São Paulo State, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2015; (2), 147–149, 2016.

Marzochi MCA & Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública*, 10(suppl 2), 1994 S359–S375.

Marzochi MC & Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saúde Pública*. 1994; 10(2): 359-75.

Marzochi MCA, Souza WJS, Coutinho SG, Grimaldi F, Momen, H. Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro: Infecção canina em áreas de procedência de casos humanos autóctones. Cepas isoladas. In: Congresso brasileiro de parasitologia, 1981; 6. Belo Horizonte, 1981. *Anais*. Belo Horizonte, p. 73.

Marzochi MCA, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort, E, et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, 2009; v. 42, n. 5, p. 570-580.

Maslov DA, Opperdoes FR, Kostygov AY, Hashimi H, Lukeš J, Yurchenko V. Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. *Parasitology*. 2019 Jan;146(1):1-27.

Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*. 1999 Sep;119 (Pt3):237-46.

Menezes JA, Luz TCB, Sousa FF, Verne RN, Lima FP, Margonari C. Fatores de risco peridomiciliares e conhecimento sobre leishmaniose visceral da população de Formiga, Minas Gerais. *Rev. bras. epidemiol.* 2016 June; 19(2): 362-374.

Menezes RC, Madeira MF, Ferreira LC, Barbosa Filho CJ, Miranda LH, Figueiredo FB. Cell-block Immunohistochemistry of Bone Marrow Aspirates: a Novel Tool to Improve the Diagnosis of *Leishmania* Infection in Dogs. *J Comp Pathol.*2016 ; v.154, p. 157–160.

Mesquita-Rodrigues C, Menna-Barreto RFS, Sabóia-Vahia L, Da-Silva SAG, De Souza EM, et al. Cellular Growth and Mitochondrial Ultrastructure of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Promastigotes Are Affected by the Iron Chelator 2,2-Dipyridyl. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, Outubro 2013, Volume 7.

Michalick MSM & Genaro O. Leishmaniose Visceral Americana. In: Neves, D.P.; Melo, A.L.; Linardi, P.M.; Vitor, R.W.A. (Ed) *Parasitologia humana*. 11º ed., Ed. Atheneu, São Paulo, 2005. p. 56-72.

Miró G, Petersen C, Cardoso L, Bourdeau P, Baneth G, Solano-Gallego L, Pennisi, et al. Novel areas for prevention and control of Canine Leishmaniosis. *Trends Parasitol* 2017. 33, 718–730.

Mohammadiha A, Mohebbali M, Haghighi A, Mahdian R, Abadi AR, 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*, 2012; 133: 89±94, 2013.

Monteiro EM, França-Silva JC, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38:147-152, 2005.

Neves DP, Melo AL, Linardi, P. M.; Vitor, R. W. A. *Parasitologia humana*. 2005; 11 ed. São Paulo: Atheneu.

NITERÓI. Centro de Controle de Zoonoses de Niterói, Rio de Janeiro. Situação da Leishmaniose Visceral Canina no Município de Niterói, RJ (2011 – 2014). 17 de setembro de 2015. Disponível em: <<http://cczniteroi.rj.blogspot.com.br/2015/09/situacao-da-leishmaniose-visceral.html>>.

Oliva G, Scalone A, Manzillo VF, Gramiccia M, Pagano A, Muccio TD, et al. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44, 1318–1322.

Oliveira AC, Figueiredo FB, Silva VL, Santos FN, Souza MB, Madeira MF, Abrantes TR, Périssé ARS. Canine visceral leishmaniasis case investigation in the jacare region of niteroi, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop.* 2015; *S. Paulo*, São Paulo, v. 57, n. 4, p. 325-332.

OMS – Organização Mundial da Saúde - Disponível em https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1/ Acesso em 14 de maio de 2021.

Pacheco LV, Borja L, Solcà M, Bastos L, Fraga D, Veras P. Comparação dos testes preconizados pelo ministério da saúde para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, [S.l.], 2015; v. 12, n. 3, p. 58-58.

Paho Organización Panamericana de la Salud. *Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis*, 2019a. www.paho.org.

Paho. Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas. *Washington, D.C.: Paho*, 2–5, 2019b <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50505>.

Peixoto HM, De Oliveira MR, Romero GA. Diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina no Brasil: revisão sistemática e metanálise. *Trop Med Int Health*. Março de 2015; 20 (3): 334-52.

Penna HA, Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil Med.1934*; v.48, p.949-50.

Pessoa-e-Silva R, Andrade TAS, Silva ACO, Oliveira GA, Trajano-Silva LAM, et al. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: confronting old problems. *Exp Parasitol* 2019; 199: 9-16.

Pinto AGS, Schubach TMP, Figueiredo FB, Baptista C, Fagundes A Barros JHS, et al. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil *Parasitol*. 2010; 137: 1653- 1660.

Pinto CM, Kalko EK, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification *Infect Genet Evol*. 2012; 12: 1328-1332.

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

Quinnell RJ & Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*.2009; v.136, n.14, p.1915-34.

Reguera RM, Morán M, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaña-Fouce R. Current, status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2016 Aug 30;227:98-114.

Rey L, Bases da Parasitologia Médica. Luís Rey. - 3.ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.: Vol. 3.ed.

Riboldi E, Carvalho F, Romão PRT, Barcellos RB, Bello GL, Ramos RR, Dallegrave E. Molecular Method Confirms Canine *Leishmania* Infection Detected by Serological Methods in Non-Endemic Area of Brazil. *The Korean Journal of Parasitology*, 2018; 56(1), 11–19.

RIO DE JANEIRO. Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro. Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil. Subsecretaria de Vigilância, Fiscalização Sanitária e Controle de Zoonoses. Superintendência de Vigilância e Fiscalização Sanitária em Zoonoses. Nota técnica n.º 01/2011/s/SUBVISA/SVFSZ. Orientações sobre vigilância, prevenção e controle da Leishmaniose Visceral (LV) em caninos, no município do Rio de Janeiro (MRJ), em virtude da confirmação de transmissão canina da doença, no bairro do Caju - Área Programática 1.0. 2011.

RIO DE JANEIRO. Secretaria de estado de saúde do Rio de Janeiro. Subsecretaria de vigilância em saúde. Superintendência de vigilância epidemiológica e ambiental. Coordenação de vigilância epidemiológica gerência de doenças transmitidas por vetores e zoonoses – GDTVZ. Boletim epidemiológico leishmanioses n° 001/2019. Cenário epidemiológico: leishmanioses em humanos no estado do RJ, Período: 01/01/2018 A 13/08/19 Rio de Janeiro, 13 de agosto de 2019.

RIO DE JANEIRO. Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Subsecretaria de vigilância em saúde. Superintendência de vigilância epidemiológica e ambiental. Coordenação de vigilância epidemiológica. Gerência de doenças transmitidas por vetores e zoonoses – GERDTVZ. Boletim epidemiológico leishmanioses n° 001/2021. Cenário epidemiológico: leishmanioses em humanos no estado do RJ, período: 01/01/2019 a 31/12/2020. Rio de Janeiro, 09 de março de 2021.

Rocha MF, Michalskye M, Lara-Silva F, Valadão JL, França-Silva JC, et al. Dogs with divergent serology for visceral leishmaniasis as sources of *Leishmania* infection for *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies – an observational study in an endemic area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2020;14(2): e0008079.

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology*, 1990; 71(3), 267–275.

Rodrigues AAF, Barbosa VA, Andrade FJD, Brazil RP. The sandfly fauna (Diptera: *Psychodidae: Phlebotominae*) of the Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2013; v. 108, n.7, p. 943-946 .

Romero GAS & Boelaert M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 2010 Dis 4(1): e584.

Roque ALR, Teixeira BR, Rocha FL, Boité MC, Xavie SCC, Lima VS. Técnicas de estudo de mamíferos silvestres reservatórios com ênfase no diagnóstico de tripanosomatídeos. Apostila do Curso de Inverno da Pós-graduação em Biologia Parasitária. INSTITUTO OSWALDO CRUZ FIOCRUZ. Ministério da saúde 2011.

Ruiz-Postigo, JÁ, et al. "Vigilância global da leishmaniose, 2017-2018, e primeiro relatório sobre 5 indicadores adicionais / Vigilância mondiale de la leishmaniose, 2017-2018, e o primeiro relatório sobre 5 indicadores suplementares." *Weekly Epidemiological Record* Gale OneFile: Health and Medicine, 2020; vol. 95,25. p. 265+.

Santo SY. Detecção e caracterização de *Leishmania* em espécimes clínicos por amplificação do gene HSP70 e análise dos perfis de restrição enzimática dos produtos amplificados. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas- FIOCRUZ.

Sevá AP, Ovallos FG, Amaku M, Carrillo E , Moreno J, Galati EAB, Lopes, E, et al . Canine-based strategies for prevention and control of visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS ONE*, 11(7), 1–20, 2016.

Sherlock IA. A importância dos flebotomíneos. In: Rangel EF, Lainson R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz. p.15-21, 2003.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi JRG. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: *Didelphidae*) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.1984; v.79, p.511.

Silva DA, et al. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Veterinary parasitology*,2011; v. 179, n. 1-3, p. 257-261, jun.

Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, Souza CM, Figueiredo FB. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol*. 2011; 79: 257-261.

Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, De Souza CM, Figueiredo FB Silva, et al. First case of autochthonous human visceral leishmaniasis in the urban center of Rio de Janeiro: case report. *Rev. Inst. Med. Trop*. 2014; 56(1): 81-4. Sao Paulo.

Silveira FT & Corbett CEP. *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: nativa ou introduzida? Uma breve revisão. *Rev Pan-Amaz Saude* [online]. 2010, vol.1, n.2, pp.143-147.

Silveira, FT, Lima, LVR, Santos, TV, Ramos P, Campos MB. Revendo a trajetória da leishmaniose visceral americana na Amazônia, Brasil: de Evandro Chagas aos dias atuais. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 7(esp), 15-22. 2016.

Soares RPP & Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): A Review. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 2003; 75(3), 301–330.

Solano-Gallego L, Cardoso L, Pennisi MG, Petersen C, Bourdeau P, Oliva G, Miró G, Ferrer L, Baneth G. Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines. *Trends Parasitol*. 2017 Sep;33(9):706-717.

Solano-gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L, Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol* , 2001; 39: 560–563.

De Souza NA, Brasil RP, Araki AS. Status atual do complexo de espécies *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: *Psychodidae*: *Phlebotominae*). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 112, n. 3, pág. 161-174, março de 2017.

Srivastava S, Shankar P, Mishra J, Singh S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2016 May 12;9(1):277.

Spinelli RM. Comparação de metodologias diagnósticas para leishmaniose visceral em cães domésticos provenientes de área de baixa transmissão nas cidades de Niterói e Maricá, Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado do Programa de Microbiologia e Parasitologia Aplicadas (PPGMPA) – UFF, 2018. Disponível em: <https://app.uff.br/riuff/handle/1/9753>.

Teodoro Ueslei et al. Flebotomíneos em área de transmissão de leishmaniose tegumentar na região norte do Estado do Paraná - Brasil: Variação Sazonal e Atividade Noturna. *Revista de Saúde Pública* [online]. 1993, v. 27, n. 3, pp. 190-194.

Travi BL, Dantas-Torres F, Miro G, Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. 1–13, 2018.

Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, LangonI, H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2009; 164(2-4): 118-123.

Valladares JE, Ruiz GR, Riera C, Alberola J, Gállego M, Espada Y, et al. Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. *Res Vet* 1998; *Sci.v.64*. n.3, p.195-198.

Werneck GL. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. *Cad Saúde Pública*, Rio de Janeiro, Abr 2010; 26(4): 644-645.

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. World health statistics. I. World Health Organization, 2015. ISBN 978 92 4 069443 9 (PDF).

Zampieri RA, Laranjeira-Silva MF, Muxel SM, Stocco DE, Lima AC, Shaw JJ, et al. Análise de fusão de alta resolução visando HSP70 como um método rápido e eficiente para a discriminação de espécies de *Leishmania*. PLoS Negl Trop Dis, 2016 10 (2): e0004485.

9. ANEXOS

9.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	
<p>Eu, _____, responsável pelo(s) canino(s) _____, autorizo a sua participação na pesquisa “Comparação de métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães domésticos provenientes de área de baixa transmissão”, coordenada pela Profa. Dra. Adriana Pittella Sudré da Universidade Federal Fluminense.</p> <p>Sei que terão amostras de sangue, medula óssea e fragmento de pele coletadas e estou ciente dos procedimentos necessários e riscos envolvidos. Estou ciente de que caso o exame seja positivo para leishmaniose, será obrigatória a notificação do resultado para o Centro de Controle de Zoonoses Regional, como é determinado pelo Ministério da Saúde e pelo Conselho Regional de Medicina Veterinária. Autorizo a confecção e utilização de fotografias e/ou vídeos destes animais.</p>	
<p>Nome: _____</p> <p>CPF: _____ Telefone: _____</p> <p>Endereço: _____</p> <p>Niterói, _____, de _____ de _____.</p>	
_____	_____
Responsável pelo(s) animal(is)	Responsável por obter o consentimento
_____	_____
Testemunha	Testemunha
<p>Médico veterinário responsável: Renan Monnerat Spinelli (CRMV-RJ 12.448), para dúvidas e/ou esclarecimentos entrar em contato: (21) 98813-4457.</p>	