MURILO ANTÔNIO FERNANDES

**Aspectos clínicos e moleculares no diagnóstico da leishmaniose
visceral canina**

Pirassununga

2016

MURILO ANTÔNIO FERNANDES

**Aspectos clínicos e moleculares no diagnóstico da leishmaniose visceral
canina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador: Prof.^a Dr.^a Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

De acordo: _____
Orientador

Pirassununga

2016

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3413
FMVZ

Fernandes, Murilo Antônio
Aspectos clínicos e moleculares no diagnóstico da leishmaniose visceral canina /
Murilo Antônio Fernandes. -- 2016.
57 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal, Pirassununga, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira.

1. Leishmaniose visceral canina. 2. Classificação clínica. 3. Testes moleculares.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Aspectos Clínicos e Moleculares no Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.", protocolada sob o CEUA nº 7839110215, sob a responsabilidade de **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira e equipe; Murilo Antonio Fernandes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 13/10/2015.

We certify that the proposal "Clinical and Molecular Aspects in Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis.", utilizing 215 Dogs (125 males and 90 females), protocol number CEUA 7839110215, under the responsibility of **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira and team; Murilo Antonio Fernandes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/13/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **06/2015** a **10/2016** Área: **0** Origem:

Espécie:	Cães	sexo:	Machos	idade:	A	N:	125
Linhagem:	N/A			Peso:	A		

Origem:

Espécie:	Cães	sexo:	Fêmeas	idade:	A	N:	90
Linhagem:	N/A			Peso:	A		

Resumo: As Leishmanioses são um conjunto de doenças infecto parasitárias, de caráter zoonótico, com manifestações clínicas com consequências bastante graves. Possui uma grande quantidade de sinais clínicos que muitas vezes é confundido com outras enfermidades. Apresentam uma grande importância em humanos infectados, principalmente a forma visceral (LV), quando não diagnosticada precocemente. No ambiente doméstico, o cão é considerado o principal reservatório epidemiológico. O sacrifício dos cães soropositivos como método de controle da LV cria um grande debate entre a comunidade acadêmico-científica, veterinários e a população em geral. Sendo assim, o diagnóstico da LVC apresenta grande importância, e bastante complexo devido à variedade de sintomas da doença e também à ocorrência de indivíduos assintomáticos. Ao mesmo tempo a Leishmaniose é uma doença que está se expandindo pelo território brasileiro, sendo necessários estudos epidemiológicos para o levantamento das áreas afetadas e a adoção de medidas de controle. Na última década as ferramentas moleculares demonstraram ser grandes aliadas na detecção da leishmaniose, e apresentam alta sensibilidade e especificidade. Uma variedade de espécimes biológicos pode ser utilizada nesses testes, como sangue e aspirado de medula óssea. O objetivo deste trabalho será comparar o desempenho de testes moleculares empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, em cães classificados em diferentes estágios clínicos da doença.

Local do experimento:

São Paulo, 03 de fevereiro de 2017

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FERNANDES, Murilo Antônio.

Título: Aspectos clínicos e moleculares no diagnóstico da leishmaniose visceral canina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: 16/12/2016.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

Instituição: USP/FZEA. Julgamento: Aprovado.

Prof. Dr. Antonio Augusto Mendes Maia

Instituição: USP/FZEA. Julgamento: Aprovado.

Prof.^a Dr.^a Andrea Higa Nakaghi

Instituição: UNISO. Julgamento: Aprovado.

DEDICATÓRIA

Dedico mais essa etapa conquistada...

... aos meus pais Antônio (in memorian) e Nadir, por todos os ensinamentos que sempre me passaram, para que eu pudesse ser a pessoa que sou hoje.

... a minha esposa Kátiele, pelo amor, companheirismo, incentivo e principalmente por entender a minha ausência em alguns momentos, para que esta conquista se tornasse realidade.

... a minha filha Lívia, pelo amor incondicional, pelos beijos, sorrisos, carinhos e alegria, que mesmo sem entender muito bem a minha distância e ausência, me fortaleceram a buscar e a não desistir.

... aos meus irmãos Marcelo e Max, pelo apoio e incentivo.

... a minha amiga e orientadora Trícia Oliveira, por ter auxiliado para que eu conseguisse chegar até aqui.

... a todos os meus mestres, desde a educação básica, passando pela graduação, até este momento. Pelo conhecimento que comigo compartilharam, que sem eles eu não conseguiria chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me permitido chegar até aqui.

A minha família, pelo incentivo.

A Prof.^a Dr.^a Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira, pelo auxílio na escolha do tema, pelo orientação, pelos conhecimentos e pela amizade.

A Universidade de São Paulo e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal – USP/FMVZ, pelo apoio e orientações passadas, em especial ao secretário de departamento no campus capital, o Sr. Danival Lopes Moreira pela dedicação e atenção nos serviços prestados.

Ao Laboratório de Saúde Animal e Segurança Alimentar e Laboratório de Medicina Preventiva Aplicada - Dep. de Medicina Veterinária/ZMV - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA/USP, em especial a Sra. Julia Cristina Benassi, pelo auxílio no processamento das amostras, dedicação e conhecimentos compartilhados.

Aos colegas de laboratório: Raphael, Laís, Guilherme, Izabelle e Vanessa, pelo companheirismo.

Ao Canil Municipal e a ONG (organização não governamental) Todo Bicho da Cidade de Pirassununga - SP, a ONG de Proteção aos Animais da Cidade de Santa Cruz das Palmeiras - SP, a Associação Protetora dos Animais de Andradina - SP, a Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira - SP e a ONG Recanto Felix da Cidade de Ilha Solteira - SP, por ceder os animais deste experimento.

Ao Júlio Cesar Pereira Spada que me recebeu em sua casa, e foi a comissão de frente nas coletas das amostras nos animais de Andradina - SP e Ilha Solteira – SP, e

também no processamento das análises de hemograma e bioquímico dos cães daquela cidade.

Ao Diogo Tiago da Silva, pelo auxílio nas coletas das amostras de cães em Andradina e Ilha Solteira, no processamento de amostras e análises estatísticas.

A Maria Luana Alves, pelo auxílio nas coletas das amostras, e no processamento das mesmas.

Aos alunos da medicina veterinária da Fundação Educacional de Andradina, pelo trabalho durante as coletas das amostras dos cães de Andradina – SP e Ilha Solteira – SP.

Ao Prof. Dr. Alan Rodrigo Panosso, professor na Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, da Universidade Estadual Paulista, departamento de matemática, pelo auxílio nas análises estatísticas.

A acadêmica Jéssica Anzolin Isaac, pelo auxílio no processamento das amostras.

Ao acadêmico João Augusto Franco Leonel, pelo auxílio no processamento das amostras.

Ao acadêmico Nuno Wolfgang Balbini Pereira, pelo auxílio no processamento das amostras.

A CAPES/CNPq e a FAPESP pelo apoio através do auxílio financeiro.

“O primeiro passo para chegar a algum lugar é decidir que você não vai ficar onde está.”

J. P. Morgan

RESUMO

FERNANDES, M. A. **Aspectos clínicos e moleculares no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** [Clinical and molecular aspects in diagnosis of canine visceral leishmaniasis]. 2016. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecto parasitárias, de caráter zoonótico, que acometem os seres humanos, animais domésticos e silvestres, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. O presente trabalho objetivou comparar o desempenho de testes moleculares empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, em cães classificados em diferentes estágios clínicos da doença. Foram coletadas amostras biológicas, sangue e suabe conjuntival, em 215 cães, das cidades de Pirassununga, Santa Cruz das Palmeiras, Andradina e Ilha Solteira, todas localizadas no Estado de São Paulo, e foram separados e classificados em quatro estágios clínicos: assintomáticos, doença leve, moderada e severa, conforme os sinais clínicos, além da sorologia, hemograma e perfil bioquímico. Além disso, os animais foram submetidos a testes moleculares de PCR convencional com os *primers* 13A/13B, MC1/MC2, Nested-PCR ITS1, com os primers LITSR e L58S, PCR em tempo real com os *primers* LEISH-1 e LEISH-2 e sonda TaqMan-MGB. Nos resultados foi observado que os primers 13A e 13B, direcionados a amplificar fragmentos de kDNA de *Leishmania* spp., possuem uma maior capacidade em detectar animais positivos no sangue em estágio inicial de sintomatologia clínica, quando comparados aos outros ($p < 0,05$). Utilizando amostras de suabe conjuntival não houve diferença significativa na detecção de animais positivos entre as diferentes fases clínicas e diferentes testes moleculares avaliados ($p > 0,05$), exceto com relação aos primers MC1 e MC2, que foram significativamente menos capazes de detectar cães positivos na fase inicial da doença que os outros ($p < 0,05$). As amostras positivas ao ITS1 sequenciadas apresentaram 99 a 100% de similaridade com *Leishmania infantum*. Podemos concluir que a PCR com os *primers* MC1 e MC2 não é indicada na detecção de cães com leishmaniose e que a PCR de sangue com os *primers* 13A e 13B é mais eficiente na detecção de animais no início da doença. Os resultados reforçam a necessidade de se aprimorar as ferramentas de diagnóstico e de se associar mais de uma técnica e/ou tipo de amostra para a detecção eficiente da leishmaniose canina.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina. Classificação clínica. Testes moleculares.

ABSTRACT

FERNANDES, M. A. **Clinical and molecular aspects in diagnosis of canine visceral leishmaniasis.** [Aspectos clínicos e moleculares no diagnóstico da leishmaniose visceral canina]. 2016. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Leishmaniasis is a group of parasitic infectious diseases with zoonotic potential that affect humans, domestic, and wild animals caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The present study aimed to compare the performance of molecular tests used in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs classified in different clinical stages of the disease. Biological samples, blood and conjunctival swab, were collected from 215 dogs from cities of Pirassununga, Santa Cruz das Palmeiras, Andradina, and Ilha Solteira, all of them located in the State of São Paulo. The animals were separated into four clinical stages: asymptomatic, mild disease, moderate disease, and severe disease according to the clinical signs, serology, hemograma, and biochemical profile. In addition, the animals were submitted to conventional PCR molecular tests with primers 13A / 13B, MC1 / MC2, Nested-PCR ITS1, with primers LITSR and L58S, real-time PCR with LEISH-1 and LEISH-2 primers, and TaqMan-MGB probe. In the results, it was observed that primers 13A and 13B directed to amplify fragments of *Leishmania* spp. kDNA have greater capacity to detect positive animals in blood and initial stage of clinical symptomatology, when compared to others ($p < 0.05$). There was no significant difference in the detection of positive animals between the different clinical phases and different molecular tests evaluated using conjunctival swab samples ($p > 0.05$), except for primers MC1 and MC2, which were significantly less able to detect positive dogs in the initial phase of the disease than the others ($p < 0.05$). Sequenced positive samples by ITS1 showed 99 to 100% similarity to *Leishmania infantum*. We can conclude that PCR with the primers MC1 and MC2 is not indicated in the detection of dogs with leishmaniasis, and the PCR of blood with the primers 13A and 13B is more efficient in the detection of animals at the beginning of the disease than others. The results reinforce the necessity to improve diagnostic tools and to associate more than one technique and/or type of sample for efficient detection of canine leishmaniasis.

Keywords: Canine Visceral Leishmaniasis. Clinical classification. Molecular tests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coleta de amostras biológicas dos animais.	39
Figura 2 - Os animais durante o exame clínico.	40
Figura 3 - Fragmentos obtidos pela cPCR com o <i>Primer</i> 13A e 13B. 1: Ladder 100 pb (Invitrogen®); 2: controle positivo <i>L. infantum</i> ; 3: controle negativo; 4 ao 19: DNA Sangue de Cães.	40
Figura 4 - Fragmentos obtidos pela cPCR com o <i>Primer</i> MC1 e MC2. 1: Ladder 100 pb (Invitrogen®); 2: controle negativo; 3: controle positivo <i>L. infantum</i> ; 4: DNA Sangue de Cão.	41
Figura 5 - Fragmentos obtidos pela Nested-PCR com o ITS. 1: Ladder 100 pb (Invitrogen®); 2: controle positivo <i>L. infantum</i> ; 3: controle negativo; 4 ao 19: DNA de Suabe Conjuntival de Cães.	42
Figura 6 - Resultados do teste qPCR de amostras de sangue e suabe conjuntival obtidas de cães.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação clínica dos cães segundo parâmetros adaptados de Solano-Gallego et al. 2011.39

Tabela 2 - Resultados de exames moleculares para a detecção da LVC, em amostras de sangue de cães classificados em diferentes estágios clínicos, usando-se a RIFI. 44

Tabela 3 - Resultados de exames moleculares para a detecção da LVC, em amostras de suabe conjuntival de cães classificados em diferentes estágios clínicos, usando-se a RIFI44

Tabela 4 - Resultados de exames moleculares para a detecção da LVC, em amostras de sangue de cães classificados em diferentes estágios clínicos, usando-se o ELISA. 45

Tabela 5 - Resultados de exames moleculares para a detecção da LVC, em amostras de suabe conjuntival de cães classificados em diferentes estágios clínicos, usando-se o ELISA.45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação clínica de leishmaniose visceral canina com base em sorologia, sinais clínicos e achados laboratoriais. Adaptado de Solano-Gallego et al. 2011.29

Quadro 2 - Nome, gene alvo e a sequência de nucleotídeos dos *primers* e sonda utilizados neste estudo.33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3	Objetivos	27
	3.1 Objetivo Geral	27
	3.2 Objetivos Específicos.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
	4.1 Aspectos Éticos	28
	4.2 Coleta De Material Biológico	28
	4.3 Avaliação Clínica.....	29
	4.4 Hemograma e Perfil Bioquímico	30
	4.5 Exames Sorológicos.....	30
	4.5.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	30
	4.5.2 Ensaio Imuno-enzimático Indireto (ELISA)	31
	4.6 Exames Moleculares	32
	4.6.1 PCR	33
	4.6.1.1 Extração do DNA	33
	4.6.1.2 Primers e sonda	33
	4.6.1.3 PCR Convencional (cPCR)	34
	4.6.1.3.1 Amplificação do DNA de Leishmania spp com os primers 13A/13B.	34
	4.6.1.3.2 Amplificação de DNA de Leishmania infantum com os primers MC1/MC2.	35
	4.6.1.4 Nested-PCR	35
	4.6.1.4.1 Amplificação do DNA de Leishmania spp. (ITS1).....	35
	4.6.1.5 Detecção e Determinação do Amplicon	36
	4.6.1.6 PCR em Tempo Real (qPCR)	36
	4.6.1.7 qPCR para a amplificação da β -actina.....	37
	4.7 Controles Positivos e Negativos	37
	4.8 Análise Estatística	37
	4.9 Sequenciamento	38
5	RESULTADOS	38
	5.1 Número de Animais	38
	5.2 Avaliação Clínica.....	39
	5.3 Exames Moleculares	40
	5.3.1 Resultados cPCR para Leishmania spp.	40

5.3.2	Resultados cPCR para <i>Leishmania infantum</i>	41
5.3.3	Resultados Nested-PCR para <i>Leishmania</i> spp.	41
5.3.4	qPCR	42
5.3.4.1	Curva Padrão do Teste	42
5.3.4.2	Resultados qPCR	42
5.4	qPCR – β actina	43
5.4.1	Curva Padrão do Teste	43
5.4.2	Resultados qPCR β -actina	43
5.4	Análise Estatística	44
5.6	Sequenciamento	45
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÕES.....	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecto parasitárias, de caráter zoonótico, que acometem os seres humanos, animais domésticos e silvestres, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que podem se manifestar de diversas formas clínicas, dependendo da espécie do parasita envolvido e da resposta imune do hospedeiro. As principais formas clínicas são a leishmaniose cutânea (LC), que compromete a pele, a leishmaniose cutaneomucosa (LCM), que afeta principalmente a mucosa nasal, septo nasal, além dos lábios e cavidade oral, e a leishmaniose visceral (LV), que pode comprometer diversos órgãos (FEITOSA, 2000).

A LV, dada a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, é também considerada emergente em indivíduos portadores de infecções pelo vírus da imunodeficiência adquirida (AIDS), tornando-se uma doença muito importante. Tem ampla distribuição, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas. Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na região Nordeste (BRASIL, 2006).

A doença está se expandindo pelo território brasileiro e já é um problema grave no Estado de São Paulo. Grande número de cães da região de Ilha Solteira sofre com a doença (TASCA et al., 2009; QUEIRÓZ et al., 2010; ASSIS et al., 2010), que atinge também os animais selvagens dessa região (JUSI et al., 2011) e cidades próximas a Pirassununga já sofrem com o problema (SÃO PAULO, 2009).

No ambiente doméstico, o cão é considerado o principal reservatório epidemiológico, sendo de grande importância na manutenção do ciclo da doença. A importância dos cães advém de o fato da leishmaniose visceral canina (LVC) ser bem mais prevalente que a humana e por apresentarem uma maior quantidade de parasitas na pele, o que favorece a infecção dos vetores (ARIAS et al., 1996a).

Sendo assim, o diagnóstico da LVC apresenta grande importância, não somente para a adoção de medidas de controle adequadas, mas também para a realização de estudos epidemiológicos. Para o diagnóstico desta doença de notificação compulsória, devem-se considerar parâmetros clínicos e epidemiológicos, bem como a pesquisa parasitológica direta ou a detecção indireta do parasito, baseado na detecção de anticorpos específicos da doença (CAMPINO et al., 2002;

SCALONE et al., 2002).

Para uma melhor acuidade diagnóstica da LVC é importante o uso de uma combinação de técnicas. Recomenda-se que o diagnóstico desta doença seja realizado baseando-se na sintomatologia clínica, nas características epidemiológicas da região e nos exames laboratoriais, contribuindo para o destino correto dos animais verdadeiramente positivos (SILVA, 2014). No presente estudo, buscou-se avaliar diferentes testes moleculares na detecção de animais positivos para a LVC em cães classificados em diferentes estágios clínicos para a doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários pertencentes a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Caracterizam-se por apresentar apenas duas formas durante o seu ciclo biológico: amastigota, quando parasitando o citoplasma das células dos tecidos do hospedeiro vertebrado; e a forma promastigota, quando se desenvolve no tubo digestivos do vetor invertebrado (flebotomíneos), bem como em meios de cultura. São parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear (REY, 2011).

As leishmanias são parasitos heteroxenos, ou seja, que vivem uma parte do seu ciclo biológico em um hospedeiro mamífero e outra parte em insetos vetores, sendo que existem várias espécies. São transmitidas entre os hospedeiros através da picada da fêmea de mosquitos conhecidos como flebotomíneos, dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (OLIVEIRA et al., 2011). Diferentes espécies de flebotomínios são os transmissores das leishmanioses nas Américas e, assim como os reservatórios, os vetores também mudam de acordo com a espécie de *Leishmania* (FUNASA, 2001).

Mais de 229 espécies de flebotomíneos já foram descritas no Brasil, dentre as quais 19 são considerados possíveis vetores das leishmanioses (SHIMABUKURO, 2007). O principal vetor da LV, *Lutzomyia longipalpis*, já foi descrito em todas as regiões do Brasil (SOUZA et al., 2009).

Considerada uma doença antiga que, em virtude de sua semelhança com outras enfermidades tropicais de caráter febril e pela ausência de lesões facilmente visíveis, durante muito tempo foi confundida com outras endemias. Existem relatos dos primeiros colonizadores espanhóis no séc. XVII da LC) retratada pelos ceramistas incas do Peru e Equador, no período pré-hispânico (REY, 2001).

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a LV como sendo uma das protozooses mais importantes, juntamente com a malária e a filariose, estando a LV e LC entre as seis mais relevantes enfermidades infecto-parasitárias do mundo (LANGONI et al., 2015), e são um desafio para a saúde pública (LOPES, 2010). A doença está associada com má nutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação, fraco sistema imunológico e falta de recursos. Uma

recente pesquisa mostra que mais de 98 países são considerados endêmicos para as leishmanioses. Estima-se que aproximadamente de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos de LV, e de 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de LT ocorrem a cada ano no mundo todo (WHO, 2016).

A LV possui grande importância, pois apresenta uma alta taxa de letalidade em humanos infectados quando estes não são diagnosticados precocemente, e não são tratados em tempo hábil. Nos últimos anos, a dispersão da infecção tem sido rápida, com novos casos sendo registrados em áreas consideradas livres da doença, tendo destaque para regiões urbanas. No Estado de São Paulo entre os anos de 1999 a 2013 foram confirmados 2.328 casos autóctones em 80 municípios (RANGEL et al., 2015).

O sacrifício dos cães soropositivos como método de controle da LV cria um grande debate entre a comunidade acadêmico-científica, veterinários e a população em geral (RIBEIRO, 2005). O impacto da eliminação através da eutanásia dos cães soropositivos para LV, no Brasil, tem sido questionado por vários autores devido a sua eficácia duvidosa, custo e resistência dos proprietários em aderir ao controle (PALATNIK de SOUSA et al., 2001).

O diagnóstico das leishmanioses ainda é um grande desafio devido à variedade de sintomas da doença e também à ocorrência de indivíduos assintomáticos. Outro aspecto muito importante diz respeito à sensibilidade e especificidade dos métodos laboratoriais rotineiramente empregados, em virtude da diversidade de parasitos encontrados nas regiões brasileiras. Algumas podem ser endêmicas tanto para *Leishmania infantum*, agente causador da LV, quanto para *Leishmania braziliensis* agente causador da LT. Além disso, há relatos de reações cruzadas com outros agentes como o *Trypanossoma cruzi* agente causador da doença de Chagas (FERRER et al., 1995).

Cães naturalmente infectados com *Leishmania* apresentam alterações hematológicas e bioquímicas. A resposta imunológica humoral, acarretada após a infecção determina alterações visíveis no perfil de proteínas plasmáticas. Além disto, devido a ação do parasita nas células do sistema fagocítico mononuclear, esses animais apresentam alterações nas funções hepáticas, como aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina, e no sistema hematopoiético. Cães sintomáticos para a LVC apresentam níveis significativamente menores de albumina e aumento dos níveis globulina, quando comparados aos cães

assintomáticos, sugerindo uma relação entre a presença de formas clínicas, com os níveis de proteína sérica e alterações da resposta imune humoral. Além disso, a anemia é um achado clínico frequente em cães naturalmente ou experimentalmente infectados com *Leishmania*. Animais infectados com LV podem também apresentar quadro clínico de azotemia renal, sugestivo de insuficiência renal crônica, sendo uma evolução grave da doença. (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2013).

Ribeiro et al. (2013), em seu trabalho, estudando cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* mostrou uma associação significativa entre anemia e a presença de sinais clínicos, onde os cães com os maiores valores de eritrograma apresentavam a melhor condição clínica. Seus resultados fornecem evidência as formas clínicas da LVC podem refletir no eritrograma.

A utilização de parâmetros hematológicos e bioquímicos como ferramenta de diagnóstico é bastante limitado. Porém estes podem ter um papel importante como biomarcadores para se avaliar a evolução clínica dos animais infectados, contribuindo para a compreensão da patogênese da LVC. A origem destas alterações hematológicas, que ocorrem tanto na série vermelha e como série branca, está relacionada a distúrbios da medula óssea, como displasia e aplasia, em consequência da doença (NICOLATO et al., 2013).

A pesquisa parasitológica direta, realizada por meio da observação de formas amastigotas do parasita em esfregaços de linfonodos, medula óssea, aspirado esplênico, biópsias hepáticas e esfregaços sanguíneos, constitui-se no método mais antigo e seguro para o diagnóstico desta enfermidade. Porém, a sensibilidade desse método é bastante baixa e depende do tipo de material biológico colhido, grau de parasitemia e tempo de leitura da lâmina (GENARO, 1993). Provas sorológicas também são utilizadas como forma de diagnóstico. Essas provas geralmente apresentam alta sensibilidade e especificidade, no entanto, podem gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos (FERRER et al., 1995; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; OLIVEIRA et al., 2008). Os testes sorológicos são bastante interessantes em inquéritos epidemiológicos, no diagnóstico de portadores assintomáticos ou na confirmação do diagnóstico, quando existe a suspeita clínica e não foi possível a visualização do parasita no esfregaço sanguíneo (LEVY et al., 1987).

A princípio os testes sorológicos como o imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) eram recomendados pelo Ministério da Saúde em inquérito epidemiológico canino (BRASIL, 2006), porém, apresentam reação

cruzada com *Trypanossoma cruzi* e outras espécies de *Leishmania* (VEXENAT et al., 1996).

Estudos já demonstraram que mais de uma espécie de *Leishmania* pode infectar um animal (MADEIRA et al., 2006), e dependendo do teste sorológico as espécies que causam a LT podem reagir positivamente para *L. infantum*, sendo indicada a realização de métodos complementares para investigação dos animais soropositivos. Além disso, com a necessidade crescente do proprietário ter certeza da presença do protozoário no animal, para concordar com a eutanásia, novos métodos moleculares foram padronizados e estão sendo utilizados, pois permitem a identificação do DNA do protozoário em amostras de suabe conjuntival, sangue, aspirado e biópsia de órgãos (HEADINGTON et al., 2002; PEREIRA et al., 2016).

Atualmente o Ministério da Saúde recomenda para triagem o uso do DPP (“Dual Path Platform”). O DPP® é um imunoensaio cromatográfico para testes de diagnóstico rápido, que foi desenvolvido pela empresa norte americana Chembio® e a empresa nacional Bio-Manguinhos®. É um teste qualitativo para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza a proteína recombinante K28, fragmentos K 26, K 39 e K9, como antígeno. Esta proteína é o produto de um gene clonado a partir de *Leishmania chagasi* e que contém uma repetição de 39 aminoácidos conservados entre as espécies viscerotrópicas de leishmania. Em testes experimentais, este teste apresentou alta sensibilidade para cães com sinais clínicos e alta especificidade para cães sem expressão clínica para LV. A presença de anticorpos 6 anti-rK39 é indicativo de infecção, e ainda não foi relatado reação cruzada com outros tripanossomatídeos. Com esses resultados, ficou estabelecido um novo protocolo de diagnóstico, onde o DPP® passou a ser utilizado como método de triagem pelas equipes de campo. Somente nos cães reagentes no DPP® é coletado soro para a realização do ELISA, dentro dos laboratórios de apoio, confirmando o diagnóstico do cão soro reagente (GRIMALDI JR. et al., 2012; SILVA et al., 2014). Estes exames deverão ser realizados nos laboratórios estaduais (LACENs) ou nos Centros de Controle de Zoonoses (CCZs) municipais (BRASIL, 2006).

A biologia molecular tem sido bastante utilizada na detecção de LVC (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; LACHAUD et al., 2002; PEREIRA et al., 2016). Dentre estes métodos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) permite identificar e ampliar seletivamente sequências de DNA do parasito. A detecção de DNA é possível em uma variedade de tecidos, como medula óssea, biópsias cutâneas, aspirados de

linfonodos, suabe de conjuntiva ocular e sangue (STRAUSS-AYALI et al., 2004; FERREIRA et al., 2008; PILATTI et al., 2009; LEITE et al., 2010; PEREIRA et al., 2016).

A PCR é uma técnica de rápido diagnóstico para a detecção de *Leishmania* spp. e o seu procedimento é suficientemente sensível, específico e reproduzível para uso na confirmação do diagnóstico clínico da LV em animais e em humanos (OZBEL et al., 2000; SILVA et al., 2001). Esta prova permite à amplificação seletiva de sequências do DNA do parasito, o que consequentemente viabiliza um instrumento diagnóstico espécie-específico para doenças infecciosas (LOPES, 2010).

Os protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, a qual pertencem os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, além de possuírem o DNA dentro do núcleo, possuem uma massa densa de DNA mitocondrial que se situa na base do flagelo, chamado de kinetoplasto. Este é composto de uma rede de moléculas de DNA circulares (kDNA), que por sua vez dividem-se em dois grupos. Um formado por moléculas grandes chamadas de maxicírculos e outro por moléculas menores chamados minicírculos. Para a detecção de *Leishmania* spp., as sequências de minicírculo do kinetoplasto são o DNA alvo da maioria dos *primers* utilizados para diagnóstico das leishmanioses (LOPES, 2010).

O fato de as leishmanioses apresentarem uma grande variedade na sintomatologia da doença e grande diversidade de hospedeiros infectados sugere a presença de variantes genéticas do parasito. Várias abordagens moleculares têm sido utilizadas na caracterização de variantes genéticas em espécies do gênero *Leishmania*: polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), análise por polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) de DNA ribossomal e de DNA do kinetoplasto; análise de regiões amplificadas de sequência confirmada; análise por hibridização de sondas de DNA (Southern Blotting) e análise de regiões de DNA com marcadores microssatélites (ALONSO, 2011).

Para encontrarmos o DNA do agente patológico no hospedeiro, pela PCR, devemos utilizar *primers* específicos, que serão responsáveis pela multiplicação da sequência de DNA correta, determinando assim a infecção do organismo pelo agente patológico ao qual estamos procurando. Por isso, selecionar corretamente o *primer* utilizado na PCR é de fundamental importância para o sucesso no diagnóstico da LVC (GABRIEL, 2013).

O DNA alvo mais empregado para a detecção de *Leishmania* spp. são as sequências de minicírculo do kinetoplasto (kDNA). Estes possuem uma característica única que possibilita a discriminação de complexos, espécies, subespécies, estirpes e até isolados de *Leishmania* spp., dependendo da região gênica que for pesquisada. Nestes casos, a PCR com estes marcadores mostra-se muito sensível para detectar casos incipientes de leishmaniose, principalmente pelo fato de estes loci apresentarem-se em muitas cópias (~10.000 cópias) por célula do parasito (LOPES, 2010).

A região genômica do primer é muito importante para a sensibilidade da PCR. Muitas regiões genômicas diferentes da *Leishmania*, como o kDNA, pequena subunidade rRNA (SSU rRNA), espaçador interno transcrito (ITS), ITS1, ITS2, sequencias de mini exons (ME) e proteínas de choque térmico (HSP70) podem ser alvos para a PCR. Koltas et al. 2016, comparando diferentes *primers* de diferentes alvos gênicos para o diagnóstico de leishmanioses, encontrou uma sensibilidade elevada no kDNA-PCR, 100% para este estudo, com uma especificidade de 86,8 %, sendo o primer ideal para ser usado no diagnóstico, principalmente quando o objetivo é a pesquisa do gênero *Leishmania*, pois foi a PCR mais sensível para leishmanioses (KOLTAS et al., 2016).

O kDNA-PCR utilizando *primers*, como os MC1 e MC2, específicos para a amplificação de segmento de *Leishmania infantum* também pode ser utilizado no diagnóstico de LV. Cortes et al. (2004), no estudo realizado por eles para testar a eficácia dos *primers* MC1 e MC2 para o diagnóstico da LV humana e canina, encontraram uma alta sensibilidade e especificidade para a detecção de DNA de *Leishmania infantum* em amostras biológicas.

Uma abordagem molecular baseada em PCR que também pode ser empregada é a Nested-PCR, que se realiza em duas etapas consecutivas, o que aumenta sua sensibilidade e especificidade. Essa variante, devido a sua alta sensibilidade tem sido recomendada para a detecção de alvos em amostras biológicas que apresente escassez de DNA. Porém, a necessidade de abertura do tubo de reação para a transferência dos amplicons, aumenta o risco de contaminação e o aparecimento de resultados falso-positivos (LANGONI et al., 2015).

O *Internal Transcribed Spacer* (ITS) é uma região não codificante encontrada na subunidade menor do ribossomo (SSU-rRNA), onde o ITS-1 é delimitado pelos genes 18S e 5.8S, enquanto o ITS-2 pelos genes 5.8S e 28S. Esse espaçador tem

sido descrito na identificação de espécies de *Leishmania* e de suas linhagens por meio da PCR-RFLP (SCHÖNIAN et al., 2003). No entanto, eles também amplificam sequências de outros tripanossomatídeos (TENÓRIO et al., 2014). As espécies clinicamente mais importantes de *Leishmania* podem ser distinguidas por análise com enzimas de restrição da região ITS1 situada entre os genes que codificam para o SSU-rRNA (SCHÖNIAN et al., 2003).

Alguns métodos podem detectar variação intra-específica entre isolados de *Leishmania* pertencentes à mesma espécie. A abordagem interna de ITS nos operons ribossomais foi usada para distinguir espécies e cepas de *Leishmania* isoladas do "Novo Mundo" com base em seus padrões de restrição característicos. No entanto, a desvantagem desta técnica é a detecção de mutações pontuais que afetam o local de restrição ou inserção, alterando o tamanho do fragmento (EL TAIL et al., 2000).

A ITS-1 PCR apresentou bons resultados em amostra de sangue, aspirado de medula ou esfregaços de lâminas coradas com Giemsa. Esses iniciadores parecem ser específicos para o gênero *Leishmania*, pois não produzem bandas frente a DNA de *T. cruzi*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Typhophywn terrestre* e *Microsporium audouini* (EL TAIL et al., 2000). Porém, utilizando a ferramenta primer-BLAST, observa-se que esses iniciadores podem amplificar regiões de outros tripanossomatídeos, inclusive *T. cruzi*, com produtos que variam de 300 a 760pb de tamanho. Apesar do baixo número de cópias do rDNA em comparação ao kDNA, suas subunidades são bem exploradas no desenvolvimento de ferramentas moleculares para diagnóstico da infecção por *Leishmania*, sendo esse alvo um dos mais explorados na identificação de espécies (SILVA et al., 2010).

A PCR em tempo real está substituindo a PCR convencional e a nested PCR no diagnóstico e acompanhamento de várias doenças, permitindo uma maior sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade na detecção de DNA em amostras biológicas. Com a tecnologia do PCR em tempo real é possível aumentar a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade da PCR. Além de, com esta técnica, ser possível quantificar a carga parasitária presente no animal infectado e identificar as espécies que infectam os animais (FRANCINO, 2006).

O sistema é baseado no uso de corantes ou sondas fluorescentes que permitem o monitoramento em tempo real do produto amplificado. Um corante bastante utilizado é a SYBR Green I, que se liga inespecificamente a fitas duplas de DNA geradas durante a amplificação. Trata-se de uma assimétrica cianina que, livre

em solução não emite fluorescência, mas, ligada a moléculas de DNA emite um forte sinal luminoso. Outra forma de gerar a fluorescência é o uso de uma sonda dirigida especificamente a uma região interna da sequência que se deseja amplificar, um exemplo deste sistema é a sonda TaqMan. À medida que vai ocorrendo a amplificação, a taq polimerase, pela sua atividade exonucleásica, desloca a extremidade 5' da sonda TaqMan (contendo o fluorocromo, reporter) e cliva a sonda. Pelo fato do repórter ser liberado e não permanecer próximo ao Quencher, há liberação de fluorescência (CAVALCANTI, 2008).

Durante um levantamento de LVC, Silva et al. (2014) também concluíram que somente um método diagnóstico não seria suficiente para o diagnóstico da doença, principalmente em cães assintomáticos. Nenhuma prova diagnóstica foi capaz de identificar um animal infectado quando usada isoladamente, necessitando da associação de outros métodos. Os resultados dos diagnósticos estão relacionados com a resposta imune do animal e da taxa de evolução da LV.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Comparar o desempenho de testes moleculares empregados no diagnóstico da LVC, em cães classificados em diferentes estágios clínicos da doença.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp., por meio da RIFI e ELISA em amostras de soro de cães.
- Avaliar e classificar clinicamente os animais, tendo como base a classificação de Solano-Galego et al. (2011).
- Detectar a presença de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de sangue e suabe conjuntival de cães.
- Avaliar, comparativamente, os resultados dos diferentes *métodos* moleculares dentro de diferentes estágios clínicos.
- Identificar as espécies que infectam os animais positivos, por sequenciamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O presente trabalho foi realizado com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, conforme o certificado n.º 7839110215.

4.2 Coleta De Material Biológico

Foram coletadas amostras biológicas em 215 cães, sem raça definida, de ambos os sexos, e idade variada, oriundos das cidades de Pirassununga, Santa Cruz das Palmeiras, Andradina e Ilha Solteira, todas localizadas no Estado de São Paulo. Todos os animais foram provenientes de canis e abrigos municipais, e também de organizações não governamentais de proteção e cuidado de animais.

Com auxílio de flocinheiras os cães foram imobilizados e a coleta de sangue foi realizada diretamente da veia cefálica ou veia jugular externa. Aproximadamente 3 a 5 mL de sangue foram colhidos por animal. O sangue coletado foi armazenado em tubos a vácuo sem anti-coagulante para a obtenção do soro e em tubos com anticoagulante para preservação do sangue. As amostras de soro e sangue foram armazenadas a -20°C para os testes sorológicos e extração de DNA, respectivamente.

As amostras de células epiteliais da conjuntiva ocular foram coletadas de cada animal, nos dois olhos, utilizando swabs estéreis produzidos para o isolamento bacteriológico. Essas amostras foram armazenadas a 4°C até a extração de DNA. Para os testes de PCR's as amostras de DNA extraídas de swabs conjuntivais, de cada olho, foram misturadas e por este motivo considerado uma amostra única de swabe conjuntival.

4.3 Avaliação Clínica

Durante a coleta de material, os cães foram submetidos a avaliação clínica, aonde foram observados parâmetros como coloração de mucosas, palpação abdominal e de linfonodos, estado corporal, alterações oculares e dermatológicas, além de outras anormalidades observadas, sendo os dados de cada animal anotados em suas respectivas fichas clínicas.

Os animais foram separados de acordo com a classificação adaptada da proposta por Solano-Gallego et al. (2011) para cães com LV. São quatro estágios clínicos: assintomáticos, doença leve (I), moderada (II), severa (III) onde, para cada estágio considerou-se os sinais clínicos dos animais, resultados de exames bioquímicos e, exames sorológicos quantitativos para o diagnóstico da LVC (Quadro 1). Aqueles animais que não apresentaram nenhum tipo de alteração clínica foram classificados como assintomáticos.

Quadro 1 – Classificação clínica de leishmaniose visceral canina com base em sorologia, sinais clínicos e achados laboratoriais

Estágios Clínicos	Sorologia	Sinais Clínicos	Achados Laboratoriais
Assintomático	Negativa.	Ausentes.	Nenhuma anormalidade clinicopatológica.
Estágio I - Doença Leve	Negativa a baixa níveis de anticorpos. *NE 0-3 ou *RIFI $\leq$ 1:40	Cães com sinais clínicos moderados como linfadenomegalia periférica, ou dermatite papular.	Usualmente sem anormalidades clinicopatológicas observadas. Creatina < 1,4 mg/dl.
Estágio II - Doença Moderada	Baixa a alta níveis de anticorpos. NE 4-5 ou 1:40<RIFI< 1:160	Cães, além dos sinais listados no estágio I, podem apresentar: lesões cutâneas difusas ou simétricas como dermatite esfoliativa/onicogrifose, ulcerações (plano nasal, coxins, proeminências ósseas, junções mucocutâneas), anorexia, perda de peso, febre e epistaxe.	Anormalidades clinicopatológicas como anemia não regenerativa leve, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome do soro hiperviscoso. Creatinina < 1,4 mg/dl.

Estágio III – Doença Severa	Média a alta níveis de anticorpos. NE 6-9 ou RIFI $\geq$ 1:160	Cães, além dos sinais listados nos estágios I e II, podem apresentar sinais originados de lesões do complexo imune: vasculites, artrites, uveítes e glomerulonefrites. E em casos muito severos: tromboembolismo pulmonar, ou síndrome nefrótica.	Anormalidades clinicopatológicas listadas no estágio II. Creatinina > 1,5 mg/dl.
-----------------------------------	---	--	---

Fonte: Adaptado de Solano-Gallego et al. (2011).

Nota: *NE=nível de ELISA; **RIFI=Reação de Imunofluorescência Indireta.

4.4 Hemograma e Perfil Bioquímico

O hemograma foi realizado conforme metodologia descrita por Garcia-Navarro e Pachaly (1994). As funções hepática e renal foram realizadas, utilizando-se *kits* comerciais para determinar as dosagens de alaninoaminotransferase (ALT), uréia e creatinina. As concentrações de proteínas totais, albumina, globulina também foram avaliadas. Os resultados foram confrontados com os valores de referência para a espécie canina.

4.5 Exames Sorológicos

4.5.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A RIFI foi realizada conforme técnica descrita por Oliveira et al. (2008). O antígeno, preparado com formas promastigotas de *L. infantum* mantidas *in vitro*, foi adicionado a pequenos círculos, previamente demarcados em lâminas de microscopia, mantidas a -20°C até o momento do uso.

No momento da realização do teste, as lâminas foram retiradas do congelador e mantidas à temperatura ambiente por quinze minutos. Foram depositados

aproximadamente 10 µL de cada amostra de soro diluída a 1:40 (ponto de corte do teste) em PBS pH=7,2, reservando-se dois poços para a adição de amostras de soros controle positivo e negativo. O conjunto foi incubado a 37° C em câmara úmida por 30 minutos e as lâminas lavadas 3 vezes, de cinco minutos cada, em solução de PBS pH= 7,2. Posteriormente, foram adicionados de 10 µL do conjugado anti-IgG canino marcado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma catalog n-F7884), diluído conforme orientação do fabricante. Em seguida, nova incubação e lavagens foram realizadas e a lâmina foi preparada para leitura com glicerol tamponado e lamínula. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência e a positividade da reação implicou na observação da fluorescência dos parasitas, comparada a amostras controle positivo e negativo, presente na mesma lâmina.

As amostras positivas nesta primeira etapa foram submetidas novamente ao teste, agora sendo o soro diluído na base dois, ou seja, nas concentrações de 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640, com a finalidade de fazer a titulação de anticorpos.

4.5.2 Ensaio Imuno-enzimático Indireto (ELISA)

O teste ELISA indireto foi realizado de acordo com a técnica descrita por Machado et al. (1997) e adaptado por Oliveira et al. (2008) para *L. infantum*. O antígeno foi produzido em laboratório a partir de promastigotas desenvolvidas em cultivo celular de amastigotas provenientes de cães sintomáticos para LV. Este material foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP Jaboticabal, SP.

Em cada cavidade da placa ELISA (fabricada em poliestireno transparente - Fabricante: Kartell S.P.A., Itália) foi adicionado 100µL do antígeno solúvel de *L. infantum* na concentração 5 µg/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio (TCBS) 0,05M, pH 9,6. Após incubação em placa, durante 8 a 10 horas em câmara úmida a 4°C, o excesso de antígeno foi removido por três lavagens consecutivas, com tampão PBS (0,01M, pH 7,4) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween 20). As placas foram bloqueadas com PBS-Tween 20 acrescidos de 6% de leite em pó, em câmara úmida, a 37°C, por 90 minutos. Após nova lavagem para retirada do bloqueador, foram adicionados em duplicata 100µL dos soros testes e dos soros de

referência positivos e negativos nas suas diluições ideais em PBSTween 20, com 5% de leite em pó desnatado. As microplacas foram novamente incubadas e lavadas. Em seguida, 100µL do conjugado (IgG de coelho anti IgG de cão, acoplada à fosfatase alcalina (SIGMA A-0793) foi diluído 1:40000 em tampão PBS-Tween 20, contendo 5% de soro de coelho. Foi adicionado a cada cavidade da placa, seguindo-se nova incubação e lavagem como as anteriores. O substrato da enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8; SIGMA N-9389), foi adicionado, aguardando-se a reação por 45 minutos em temperatura ambiente. Decorrido esse período, a leitura da reação foi realizada em um leitor de microplacas de ELISA (EL800 Universal Microplate Reader Bio-TEK Instruments, INC.), a um comprimento de onda de 405 nm. Os valores de densidade óptica média (D.O.) dos soros foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variam de 0 (zero) a 9 (nove). O limite máximo do nível zero foi determinado pela média das D.O. de animais negativos para *L. infantum*, acrescido de dois desvios padrão. A partir desse limite, os intervalos entre os outros níveis de ELISA foram definidos por acréscimo de 35%, e o ponto de corte do teste de ELISA correspondeu a duas vezes e meia o valor médio das D.O. dos soros de referência negativos, conforme preconizado por (VOLLER; BIDWELL; BARTLETT; 1980). A atividade imunológica de cada soro testado foi calculada mediante a determinação do valor A/P (amostra em relação ao positivo), considerando-se os soros de referência negativos e positivos, de acordo com a seguinte equação:

$$A/P = \frac{\text{Absorbância média da amostra} - \text{Absorbância média do soro de referência negativo}}{\text{Absorbância média do soro de referência positivo} - \text{Absorbância média do soro de referência negativo}}$$

4.6 Exames Moleculares

Os testes moleculares utilizados no presente trabalho foram os de PCR (Reação de Cadeia de Polimerase), descritos a seguir.

4.6.1 PCR

Antes da realização dos PCRs, as amostras foram preparadas para a execução de cada exame.

4.6.1.1 Extração do DNA

Extração de DNA do sangue total dos animais foi realizada utilizando-se o kit de extração DNA Isolation Kit for Blood & Tissues (Qiagen, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A extração de DNA do suabe conjuntival foi realizada pela técnica de *salting out* descrita por Lahiri e Nurnberger (1991); com algumas modificações.

4.6.1.2 Primers e sonda

Os *primers* utilizados (Quadro 2) para a PCR convencional foram os 13A e 13B, para *Leishmania* spp., descritos previamente por Rodgers, Popper e Wirth (1990) e MC1 e MC2, específicos para *L. infantum*, descritos por Cortes et al. (2004). Para o Nested-PCR ITS1, os primers LITSR e L58S, para *Leishmania* spp., descritos por El Tail et al. (2000). Para o qPCR, os *primers* LEISH-1 e LEISH-2, que amplificam *Leishmania* spp., juntamente com a sonda TaqMan-MGB, que garante a especificidade do teste para *Leishmania infantum*, descrito por Francino et al. (2006). E também os *primers* β -actin_Senso e β -actin_AS e a sonda fluorogênica para o qPCR usado para amplificar a β -actina, conforme descrito por Manna et al. (2006).

Quadro 2 – Nome, gene alvo e a sequência de nucleotídeos dos *primers* e sonda utilizados neste estudo

NOME	GENE ALVO	Sequência (sentido 5'-3')
13 A	kDNA <i>Leishmania</i> spp.	GTGGGGGAGGGGCGTTCT
13 B	kDNA <i>Leishmania</i> spp.	ATTTTACACCAACCCCCAGTT
MC1	kDNA <i>Leishmania infantum</i>	GTTAGCCGATGGTGGTCTTG
MC2	kDNA <i>Leishmania infantum</i>	CACCCATTTTTCCGATTTTG
LITSR	SSU-rDNA <i>Leishmania</i> spp.	CTGGATCATTTTCCGATG
L5-8S	SSU-rDNA <i>Leishmania</i> spp.	TGATACCACTTATCGCACTT
LEISH-1	kDNA <i>Leishmania</i> spp.	AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG
LEISH-2	kDNA <i>Leishmania</i> spp.	ACCCCCAGTTTCCCGCC
Sonda TaqMan-MGB	kDNA <i>Leishmania infantum</i>	AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG
β -actin_Senso	Gene da β -actina de mamíferos.	CTGGCACCACACCTTCTACAA
β -actin_AS	Gene da β -actina de mamíferos.	GCCTCGGTCAGCAGCA
Sonda Fluorogênica	Gene da β -actina de mamíferos.	CCACGCGCAGCTCG

Fonte: Fernandes, M. A. (2016)

4.6.1.3 PCR Convencional (cPCR)

4.6.1.3.1 Amplificação do DNA de *Leishmania* spp com os primers 13A/13B.

A mistura para a reação foi preparada do seguinte modo: 2,5 μ L de tampão (200 mM Tris-HCl/ μ L; 500 mM KCl/ μ L, pH 8,4), 0,75 μ L de MgCl₂ (1,5 mM/ μ L), 0,5 μ L de dNTP's (10 mM/ μ L), 1,5 μ L de cada primer (13A/13B) (10 pmol/ μ L), 0,15 μ L de Taq (5 U/ μ L), quantidade suficiente de água Milli-Q para completar 22,5 μ L e 2,5 μ L de DNA (10ng/ μ L), totalizando um volume final de 25 μ L. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador (AB Vereti 96Well Thermal Cycler) com ciclos de: Desnaturação Inicial: 94° C (3 min); e 35 ciclos: D: 94°C (40 seg); A: 56°C (30 seg); E: 72°C (30 seg); E final: 72°C (5 min). O produto final amplificado da reação positiva para *Leishmania* spp. é de 120 pares de base (pb).

4.6.1.3.2 Amplificação de DNA de *Leishmania infantum* com os primers MC1/MC2.

A mistura para a reação foi preparada do seguinte modo: 2,5 µL de tampão (200 mM Tris-HCl/ µL; 500 mM KCl/ µL, pH 8,4), 0,75 µL de MgCl₂ (1,5 mM/ µL), 0,5 µL de dNTP's (10 mM/ µL), 1,5 µL de cada primer (MC1/MC2) (10 pmol/ µL), 0,15 µL de Taq (5 U/ µL), quantidade suficiente de água Milli-Q para completar 22,5 µL e 2,5 µL de DNA (10ng/ µL), totalizando um volume final de 25µl. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador (AB Vereti 96Well Thermal Cycler) com ciclos de: 1 ciclo: D – 94°C (2 min) e 30 ciclos: D – 94°C (20 seg); A – 60°C (20 seg); E – 72°C (30 seg); Efinal – 72°C (5 min). O produto final da reação positiva para *Leishmania infantum* é de 447 pb.

4.6.1.4 Nested-PCR

4.6.1.4.1 Amplificação do DNA de *Leishmania* spp. (ITS1)

A mistura para a amplificação foi preparada utilizando: 2,5 µL de tampão de PCR (50 mM Tris-HCl/ µL; 10 mM KCl/ µL), 0,75 µL de MgCl₂ (1,5 mM/ µL), 2 µL de dNTP's (10 mM/ µL), 0,15 µL de Taq-polimerase (Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen®) (5 U/ µL), 1,25 µL de cada *primer* (LTISR/L5-8S) (10 pmol/ µL) e 28,3 µL de água deionizada estéril, totalizando o volume final para cada reação de 25 µL. Para a primeira amplificação foram adicionados 2,5 µL de DNA extraído de cada amostra. Em seguida, a reação de amplificação foi conduzida em um termociclador (AB Vereti 96Well Thermal Cycler). A desnaturação inicial compreende um ciclo de 95°C (4 min) e 35 ciclos a 95°C (30 seg). A temperatura de anelamento corresponde a 53°C (30 seg) e 72°C (1 min). A extensão final corresponde a 72°C (5 min). Finalizada essa

etapa, para a Nested-PCR, foram adicionados 2,5 μ L do produto amplificado na primeira reação a uma nova mistura preparada como descrito anteriormente. A segunda reação de amplificação foi conduzida novamente em um termociclador, seguindo as mesmas etapas de desnaturação, anelamento e extensão final descritas. O produto final amplificado da reação positiva apresenta de 300 a 350bp de comprimento, sendo variável de acordo com a espécie de *Leishmania*.

4.6.1.5 Detecção e Determinação do Amplicon

Os produtos de PCR foram visualizados pela luz ultra-violeta (UV) após a eletroforese em gel agarose 1,5% (para fragmentos de 300-350bp e 447pb) e 2,0% (fragmentos de 120pb), contendo o corante SYBR® safe (Invitrogen®) em tampão Tris-borato (pH 8.0). O marcador de DNA de 100bp - DNA Molecular Weight Marker (Amresco®) foi utilizado para estimarmos o tamanho do amplicon.

4.6.1.6 PCR em Tempo Real (qPCR)

A reação foi realizada conforme técnica descrita por Francino et al. (2006). Foi utilizado o kit LightCycler® 480 Probes Master (Roche®, Life Science, Brasil) em volume 20 μ L sendo 10 μ L de 2x concentrado PCR Mix contendo FastStart Taq DNA Polymerase, tampão de reação, dNTP mix e 6,4nM MgCl₂, 1,8 μ L de cada oligonucleotídeo (900nM de cada oligonucleotídeo), 0,4 μ L de sonda (200nM) e 1 μ L de amostra foram utilizados. As reações de amplificação foram conduzidas no termociclador LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) com ciclos de: 95°C (10 min.); 50 ciclos a 95°C por 15 seg., 50°C por 1 min. e 72°C (1 seg.). Os produtos da qPCR foram analisados com o programa específico do equipamento e a eficiência de cada reação foi determinada baseada na curva padrão. Os valores foram expressos em Cycle Threshold (Ct), ou seja, o valor que a amostra atinge a linha Threshold determinada após o cálculo da eficiência de cada reação.

4.6.1.7 qPCR para a amplificação da β -actina

Com o objetivo de eliminar falsos negativos devido a problemas com a quantidade de DNA extraído, degradação da amostra ou falha da PCR, realizou-se uma reação de PCR em tempo real para amplificar a β -actina, conforme descrito por Manna et al. (2006). O gene foi amplificado com os *primers* 5'-dCTG GCA CCA CAC CTT CTA CAA-3', e 5'-dGCC TCG GTC AGC AGC A-3' e sonda fluorogênica 5'-CCAC GCG CAG CTC G- 3'. A curva padrão absoluta, utilizada para esta reação, foi a desenvolvida por Pereira et al. (2016).

4.7 Controles Positivos e Negativos

Como controles positivos foram utilizadas amostras de DNA de *L. infantum* MCAN/BR/1984/CCC-17.481 e *L. braziliensis* MCAN/BR/1987/CLIOC-898, cedida pelo Laboratório do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, e como controle negativo água deionizada estéril. Amostras de cães sabidamente positivos e negativos (exames parasitológicos, sorológicos e moleculares positivos e negativos) também foram utilizadas como controles.

4.8 Análise Estatística

Os dados de cães positivos pelos exames moleculares de cPCR, Nested-PCR e qPCR foram avaliados pelo teste de proporção (Qui-quadrado) onde se respeitou o intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$) dentro de cada classificação clínica (Assintomáticos, Estágio I, Estágio II, Estágio III). Todas as análises foram geradas no programa R, versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2016).

4.9 Sequenciamento

Após eletroforese em gel de agarose a 1%, os produtos da PCR foram retirados do gel e purificados usando o *kit* Illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification (GE Healthcare, New York, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento de DNA foi realizado utilizando 20ng/ul de produto purificado da PCR e 5µM de cada *primer*. As amostras foram enviadas ao Serviço de Sequenciamento de DNA do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco - Instituto Biológico (IB) da Universidade de São Paulo (USP).

Os cromatogramas obtidos com os *primers* senso e anti-senso foram montados no software Sequence Scanner 2 v2.2 e comparadas no Clustal W (disponível no *software* BioEdit Sequence Alignment Editor, versão 7.1.11, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA). O programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) foi utilizado para analisar as sequências de nucleotídeos (BLASTN), objetivando-se procurar e comparar genes similares em banco de dados internacionais (GenBank) com as sequências obtidas.

5 RESULTADOS

5.1 Número de Animais

Foram coletadas amostras biológicas em 215 animais, sendo 99 oriundos das cidades de Pirassununga e Santa Cruz das Palmeiras, e 116 animais oriundos das cidades de Andradina e Ilha Solteira. (Figura 1)

Figura -1 Coleta de amostras biológicas dos animais

Fonte: Fernandes, M. A. (2016).

5.2 Avaliação Clínica

Os animais foram avaliados (Figura 2) e classificados quanto à presença ou não de sinais clínicos que possam estar relacionados à LVC, segundo parâmetros adaptados de Solano-Gallego et al. (2011). Foram utilizados dois parâmetros sorológicos diferentes para a classificação, a RIFI e o ELISA. Os resultados obtidos na separação dos animais conforme a classificação clínica estão na tabela 1.

Tabela 1 - Classificação clínica dos cães segundo parâmetros adaptados de Solano-Gallego et al. 2011

Classificação Clínica	SOROLOGIA	
	RIFI	ELISA
Assintomáticos	22,3%(48/215)	22,3%(48/215)
Estágio I	67,5%(145/215)	67,5%(145/215)
Estágio II	4,2%(9/215)	7,0%(15/215)
Estágio III	6,0%(13/215)	3,2%(7/215)

Fonte: Fernandes, M. A. (2016).

Figura – 2 Os animais durante o exame clínico.

Fonte: FERNANDES, M. A. (2016).

5.3 Exames Moleculares

5.3.1 Resultados cPCR para *Leishmania* spp.

As 215 amostras de sangue e de suabe conjuntival foram submetidas a análise de cPCR, para detecção de DNA de *Leishmania* spp., utilizando os pares de *primers* 13A e 13B. Nas amostras positivas houve amplificação de fragmentos de DNA de 120 pb conservados do minicírculo do cinetoplasto. Do total de amostras analisadas, o teste apresentou 19,53% (42/215) de animais positivos para as amostras de sangue, e 13,02% (28/215) para as amostras de suabe conjuntival. Os resultados estão exemplificados na figura 3.

Figura 3 – Fragmentos obtidos pela cPCR com os *primers* 13A e 13B

Fonte: Fernandes, M. A. (2016).

Legenda: 1: Ladder 100 pb (Invitrogen®); 2: controle positivo *L. infantum*; 3: controle negativo; 4 ao 19: DNA Sangue de Cães em diferentes estágios clínicos.

5.3.2 Resultados cPCR para *Leishmania infantum*

A cPCR, para detecção de DNA de *Leishmania infantum*, utilizando os pares de *primers* MC1 e MC2, apresentou, para as amostras analisadas, 0,47% (1/215) de positivos tanto para amostras de sangue, como em amostras de suabe conjuntival. A figura 4 está exemplificado o resultado de uma amostra positiva no DNA extraído de sangue.

Figura 4 – Fragmentos obtidos pela cPCR com os *primer* MC1 e MC2

Fonte: Fernandes, M. A. (2016).

Legenda: 1: Ladder 100 pb (Invitrogen®); 2: controle negativo; 3: controle positivo *L. infantum*; 4: DNA Sangue de Cão classificado no estágio III.

5.3.3 Resultados Nested-PCR para *Leishmania* spp.

Do total de amostras analisadas, o teste apresentou 9,76% (21/215) de animais positivos para as amostras de sangue, e 7,90% (17/215) para as amostras de suabe conjuntival. Os resultados estão exemplificados na Figura 5.

Figura 5 – Fragmentos obtidos pela Nested-PCR com os *primers* ITS1

Fonte: Fernandes, M. A. (2016).

Legenda: 1: Ladder 100 pb (Invitrogen®); 2: controle positivo *L. infantum*; 3: controle negativo; 4 ao 19: DNA de Suabe Conjuntival de Cães em diferentes estágios clínicos.

5.3.4 qPCR

5.3.4.1 Curva Padrão do Teste

Os testes de qPCR para a detecção de *Leishmania infantum*, nas 215 amostras de sangue e suabe conjuntival, foram realizados utilizando a curva externa de detecção padronizada por Benassi (2015), com uma eficiência de 106%, inclinação da curva (slope) de -3,17, a intersecção no eixo Y de 34,11, e o R² de 0,99. O teste é válido unicamente se a fluorescência do controle negativo for negativo e o controle positivo apresentar um sinal não contestável (Ct<38,59).

5.3.4.2 Resultados qPCR

Dos 215 cães avaliados, foram positivas 6,97% (15/215) amostras de sangue e 11,16% (24/215) amostras de suabe conjuntival. Os resultados estão exemplificados na figura 6.

Figura 6 – Resultados do teste qPCR de amostras de sangue e suabe conjuntival obtidas de cães

Fonte: Fernandes, M. A. (2016).

5.4 qPCR – β actina

5.4.1 Curva Padrão do Teste

Os testes de qPCR para o gene da β -actina em 46 amostras, selecionadas aleatoriamente entre as que apresentaram resultados negativos para os testes moleculares foram realizados utilizando a curva de detecção padronizada por Pereira et al. (2016), com uma eficiência de 103%, inclinação da curva (slope) de -3,24, a intersecção no eixo Y de 57,86.

5.4.2 Resultados qPCR β -actina

Dos 136 animais negativos para os testes realizados, foram selecionadas aleatoriamente 46 amostras (33,82%) que foram submetidas ao teste de qPCR β -actina, obtendo resultado positivo em 100% das amostras testadas.

5.4 Análise Estatística

Os resultados do teste de Qui-quadrado estão descritos nas tabelas 2 a 5.

Tabela 2 – Resultados de exames moleculares para a detecção da LVC, em amostras de sangue de cães classificados em diferentes estágios clínicos, usando-se a RIFI.

Classificação Clínica/RIFI	Métodos de exames moleculares - PCR do sangue			
	13A/13B	MC1/MC2	ITS1	RT
Assintomático (N= 48)	09 ^a	00 ^b	06 ^a	04 ^a
Estágio I (N= 145)	25 ^a	00 ^c	11 ^b	07 ^b
Estágio II (N= 09)	03 ^a	00 ^a	01 ^a	01 ^a
Estágio III (N= 13)	05 ^a	01 ^a	03 ^a	03 ^a
Total Geral (N= 215)	42 ^a	1 ^c	21 ^b	15 ^b

Fonte: Fernandes, M. A. (2016).

Nota: Teste de proporção (qui-quadrado). Diferentes letras minúsculas (a, b, c) indicam significância estatística entre colunas ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

Tabela 3 – Resultados de exames moleculares para a detecção da LVC, em amostras de suabe conjuntival de cães classificados em diferentes estágios clínicos, usando-se a RIFI.

Classificação Clínica/RIFI	Métodos de exames moleculares - PCR do suabe conjuntival			
	13A/13B	MC1/MC2	ITS1	Real Time
Assintomático (N= 48)	5 ^a	0 ^a	4 ^a	3 ^a
Estágio I (N= 145)	17 ^a	0 ^b	10 ^a	15 ^a
Estágio II (N= 09)	3 ^a	0 ^a	0 ^a	3 ^a
Estágio III (N= 13)	3 ^a	1 ^a	3 ^a	3 ^a
Total Geral (N= 215)	28 ^a	1 ^b	17 ^a	24 ^a

Fonte: Fernandes, M. A. (2016).

Nota: Teste de proporção (qui-quadrado). Diferentes letras minúsculas (a, b, c) indicam significância estatística entre colunas ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

Tabela 4 – Resultados de exames moleculares para a detecção da LVC, em amostras de sangue de cães classificados em diferentes estágios clínicos, usando-se o ELISA.

Classificação Clínica/ELISA	Métodos de exames moleculares - PCR do sangue			
	13A/13B	MC1/MC2	ITS1	RT
Assintomático (N= 48)	9 ^a	0 ^b	6 ^a	4 ^{ab}
Estágio I (N= 145)	25 ^a	0 ^c	10 ^b	7 ^b
Estágio II (N= 15)	4 ^a	0 ^a	1 ^a	0 ^a
Estágio III (N= 07)	4 ^a	1 ^a	4 ^a	4 ^a
Total Geral (N= 215)	42 ^a	1 ^c	21 ^b	15 ^b

Fonte: Fernandes, M. A. (2016).

Nota: Teste de proporção (qui-quadrado). Diferentes letras minúsculas (a, b, c) indicam significância estatística entre colunas ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

Tabela 5 – Resultados de exames moleculares para a detecção da LVC, em amostras de suabe conjuntival de cães classificados em diferentes estágios clínicos, usando-se o ELISA.

Classificação Clínica/ELISA	Métodos de exames moleculares - PCR do suabe conjuntival			
	13A/13B	MC1/MC2	ITS1	Real Time
Assintomático (N= 48)	5 ^a	0 ^a	4 ^a	3 ^a
Estágio I (N= 145)	16 ^a	0 ^b	10 ^a	14 ^a
Estágio II (N= 15)	4 ^a	0 ^a	1 ^a	3 ^a
Estágio III (N= 07)	3 ^a	1 ^a	2 ^a	4 ^a
Total Geral (N= 215)	28 ^a	1 ^b	17 ^a	24 ^a

Fonte: Fernandes, M. A. (2016).

Nota: Teste de proporção (qui-quadrado). Diferentes letras minúsculas (a, b, c) indicam significância estatística entre colunas ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

5.6 Sequenciamento

Fragmentos com aproximadamente 300pb na cPCR com os *primers* ITS1 selecionados apresentaram uma similaridade de 99% a 100% com sequências de *L. infantum* disponíveis no GenBank.

6 DISCUSSÃO

Ao classificarmos os animais nos estágios clínicos proposto por Sollano-Gallego (2011), levamos em consideração os títulos de anticorpos, por este motivo fizemos a classificação utilizando dois testes sorológicos, a RIFI e o ELISA comumente utilizados para o diagnóstico da LVC. Pela diferença de sensibilidade e especificidade dos testes esperávamos que a utilização de um ou outro teste sorológico em questão pudesse alterar a classificação dos animais nos estágios clínicos. Porém, por este presente estudo pudemos observar que não obtivemos diferenças discrepantes na classificação dos animais nos diferentes estágios clínicos. Sendo assim, os resultados encontrados estão de acordo com o estudo de Távora et al. (2007), que avaliaram a concordância entre os testes de ELISA e RIFI em 370 cães, para o diagnóstico de *Leishmania* spp. e encontraram uma forte concordância entre os testes, em determinar cães positivos e negativos ($p < 0,01$), mostrando serem estes dois testes eficientes em triagens sorológicas.

Queiroz et al. (2010), estudando testes diagnósticos de imunoistoquímica e PCR, em associação com a RIFI e o ELISA, em tecidos cutâneos, separando os animais em assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos, observaram que houve alteração na eficiência dos testes, em detectar animais positivos, de acordo com a evolução clínica da LVC. Já Courtenay et al. (2002) observaram correlação positiva entre grau parasitário, infectividade, nível de anticorpos anti-*Leishmania* spp., detecção de DNA do parasita por PCR e presença de sinais clínicos.

No presente estudo foram encontradas, diferenças significativas na detecção de animais positivos com DNA extraído do sangue de cães, sendo que a cPCR com o par de primers 13A/13B, cujo o gene alvo é o kDNA de *Leishmania* spp., detectou uma quantidade significativamente maior de positivos (19,53%) ($p \leq 0,05$), quando comparado aos demais testes. Com relação aos primers ITS1 (9,77%), gene alvo rDNA, e o qPCR (6,98%), gene alvo kDNA, com a sonda específica para *L. infantum*, apesar do ITS1 apresentar um valor maior, não houve diferença significativa entre eles ($p > 0,05$). Já a cPCR com os primers MC1/MC2 (0,47%), apresentou um valor significativamente menor na capacidade de detecção de animais positivos, quando comparado aos outros testes ($p \leq 0,05$).

Nos resultados de amostras de suabe conjuntival, apesar da cPCR 13A/13B, também apresentar uma maior detecção de animais positivos (13,02%), quando comparado à ITS1 (7,91%) e à qPCR (11,16%), não houve diferença significativa entre a detecção de positivos por estes três testes ($p>0,05$). A qPCR no caso das amostras de suabe conjuntival, foi um pouco superior ao ITS1. A cPCR MC1/MC2 (0,47%), foi estatisticamente inferior na detecção de animais positivos, quando comparado aos demais testes ($p<0,05$).

O kDNA é considerado o alvo mais sensível na detecção de *Leishmania* spp., pois apresenta cerca de 10.000 minicírculos de DNA distribuídos em aproximadamente 200pb de região conservada e 600pb de região variável, sendo assim o mais utilizado no diagnóstico das leishmanioses. Esses marcadores possuem uma característica única que possibilita a discriminação de complexos, espécies, subespécies, estirpes e até isolados de *Leishmania* spp., dependendo da região genômica a ser pesquisada. Além disto mostram-se sensíveis em detectar casos incipientes de leishmaniose (LOPES, 2010).

Lopes et al. (2016), em seu estudo para determinar a performance de *primers* utilizados em cPCR direcionados a amplificar gene kDNA e DNA nuclear de leishmanias encontrou uma alta sensibilidade dos que amplificam kDNA, como os *primers* 13A/13B (RODGERS et al., 1990), pois como já descrito, o locus gênico que eles amplificam está presente em milhares de cópias no genoma celular do parasita, explicando assim a maior sensibilidade analítica da cPCR baseada em *primers* de kDNA. Além disso, neste mesmo estudo mostrou que a cPCR não parece ser mais sensível do que as técnicas sorológicas, mas é um método bastante eficiente, principalmente quando o exame é realizado em mais de um tipo de amostra do mesmo animal, pois uma análise usando uma única técnica pode facilmente produzir um diagnóstico falso negativo, já que foi encontrada uma quantidade considerável de cães que foram positivos pela PCR realizada em amostras de baço, mas negativos em amostras de medula óssea e vice-versa.

Koltas et al. (2016), comparando 6 diferentes *primers* de diferentes alvos gênicos para o diagnóstico de leishmanioses, encontrou uma sensibilidade elevada no kDNA-PCR, 100% para este estudo, com uma especificidade de 86,8 %, sendo o primer ideal para ser usado no diagnóstico, principalmente quando o objetivo é a pesquisa do gênero *Leishmania*, pois foi a PCR mais sensível para leishmanioses.

Eles sugerem ainda que o ITS1-PCR pode ser utilizado para a discriminação de *Leishmania* spp., pois mostrou-se bastante sensível.

Podemos assim assegurar que os dados apresentados neste estudo estão em conformidade com os encontrados em outros trabalhos, mostrando uma maior sensibilidade do cPCR de kDNA, para detectar animais positivos para *Leishmania* spp.. Pelos resultados obtidos podemos observar também que a cPCR 13A/13B detectou um número maior de animais positivos em todos os estágios clínicos em que os animais foram classificados. Porém, só houve uma diferença significativa ($p \leq 0,05$), nos classificados no estágio I, mostrando que esta técnica é útil em detectar estágios iniciais da infecção por *Leishmania* spp..

Os *primers* utilizados no qPCR, LEISH-1 e LEISH-2 são semelhantes as sequencias de gene alvo dos *primers* 13A/13B, com pequenas modificações e a utilização da sonda TaqMan-MGB determina a especificidade para o kDNA de *Leishmania infantum* (FRANCINO, 2006). Por este motivo observamos no presente estudo uma diferença significativamente menor detecção de animais positivos no qPCR, comparado com o cPCR 13A/13B ($p \leq 0,05$) para amostras de sangue, pois mesmo sendo um teste diagnóstico com uma alta sensibilidade, o mesmo possui uma alta especificidade para *L. infantum*. No caso das amostras de suabe conjuntival, não observamos diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os testes.

Os *primers* MC1/MC2 tem como gene alvo também o kDNA, porém em segmento específico para *Leishmania infantum*, conforme descrito por Cortes et al. (2004). Os resultados observados com esses *primers*, quando comparados ao qPCR apresentaram ($p \leq 0,05$) uma detecção significativamente menor de animais positivos, apresentando similaridade de animais positivos apenas no estágio mais severo de doença clínica, o estágio III. Provavelmente isto ocorra pela menor sensibilidade dos *primers* MC1/MC2, detectando animais com uma maior carga parasitária, e pelo fato do qPCR ter a sensibilidade de detectar DNA do parasita mesmo em amostras com quantidade pequena de material genético.

A Nested-PCR utilizando o ITS1, nos testes realizados apresentou uma detecção significativamente ($p \leq 0,05$) menor de animais positivos quando comparado à cPCR 13A/13B, porém sem diferença significativa com relação à qPCR.

Pudemos observar também que somente a cPCR MC1/MC2 não detectou animais positivos clinicamente classificados como assintomáticos, e que apesar da

cPCR 13A/13B apresentar um número maior de positivos assintomáticos, não houve diferença significativa quando comparado aos testes Nested-PCR ITS1 e qPCR.

7 CONCLUSÕES

- Neste estudo, não encontramos diferença significativa na classificação clínica, usando os testes sorológicos RIFI ou ELISA.
- No presente trabalho observamos que os *primers* 13A e 13B, direcionados a amplificar fragmentos de kDNA de *Leishmania* spp., possuem uma maior capacidade em detectar animais positivos no sangue, principalmente em animais no estágio inicial de sintomatologia clínica.
- Utilizando amostras de suabe conjuntival não houve diferença significativa na detecção de animais positivos entre as diferentes fases clínicas e diferentes testes moleculares avaliados. Exceto com relação aos *primers* MC1 e MC2, que foram significativamente menos capazes de detectar cães positivos na fase inicial da doença que os outros.
- As amostras positivas ao ITS1 sequenciadas apresentaram 99 a 100% de similaridade com *Leishmania infantum*.
- Há a necessidade de se aprimorar as ferramentas de diagnóstico ou associar mais de uma técnica e/ou tipo de amostra para a detecção correta da LVC.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, D. P. **Utilização de marcadores moleculares no estudo populacional de *Leishmania infantum chagasi* no Brasil**. 2011. falta n. de página total por ex. 75p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu. 2011.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; . Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Londres, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ARIAS, J.; BELTRAN, F.; DESIEUX, P.; WALTON, B. **Epidemiología y control de la leishmaniasis en la Américas, por país o territorio**. Washington. Organización Panamericana de la Salud (OPAS), 1996a. 52p. (Cuaderno Técnico, 44).
- ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G P.; SIVEIRA, R. C. V.; NUNES, C. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S. O.; NORONHA JR., A. C. F.; NEVES, M. F; MACHADO, R. Z.; BUZETTI, W. Ap. S. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 18-26, 2010.
- BENASSI, J. C. **Deteção de *Leishmania* spp. por PCR em tempo real em amostras de suabe conjuntival de cães, gatos e equinos**. 2015. 74f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2006, 120 p.
- CAMPINO, L.M. Canine reservoirs and Leishmaniasis: Epidemiology and disease. In: FARRELL, J.P. **World Class Parasites: volume 4 Leishmania**. Norwell: Kluwer Academic, 2002 p. 45-57.
- CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* sl-specific kinetoplastid oligonucleotídeos. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 12-17, 2004.
- COURTENAY, O.; QUINNEL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in áreas of high transmission. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314-1320, 2002.
- DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPEBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *leishmania* – a mini review. **Memoria Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 463-469, 1994.
- EL TAIL, N. O.; OSMAN, O. F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.; SCHONIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation

polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 575-579, 2000.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTO, M.C.; PERRI, S.H.; Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba- SP, Brasil. *Clínica Veterinária*, v.5, n. 28, p.36-44, 2000.

FERRER, L.; AISA, M.J.; ROURA, X.; PORTUS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Record*, London, v.136, n. 20, p.514-516, 1995.

FERREIRA, S. A.; ITUASSU, L. T.; MELO M. N.; ANDRADE, A. S. R. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.152, p. 257-263, 2008.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEDO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SANCHEZ, A.; X. Roura Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p.214-221, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001, p. 27.

GABRIEL, J. E. Evaluating the specificity of primers employed for PCR-based diagnostica of Leishmaniasis using multiple alignment analysis. **Estudos Biologia: ambiente e diversidade**, v. 35, n. 84, p. 107-112, 2013.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 1993. 202f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GRIMALDI JR., G.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; SANTOS, C. B.; PINTO, I. S.; AZEVEDO, C. T. de; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 54-59, 2012.

HEADINGTON, C.E.; BARBARA, C. H.; LAMBSON, B. E.; HART, D. T. BARKER, D. C. Diagnosis of leishmaniasis in Maltese dogs with the aid of the polymerase chain reaction, v. 96, p. 195-197, 2002. Supplement 1.

JUSI, M. M. G.; STARKE-BUZETTI, W. A.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; TENÓRIO, M. S.; SOUZA, L. O.; MACHADO, R. Z. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 2, p. 219-222, jul. set. 2011.

KOLTAS I. S.; EROGLU, F.; UZUN, S.; ALABAZ, D. A comparative analysis of different molecular targets using PCR for diagnosis of old world leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 164, p. 43-48, 2016.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 210-215, 2002.

LANGONI, H.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; SCREMIN, C.; TRONCARELLI, M. Z.; CAMARGO, J. B.; MACHADO, J. G.; ULMANN, L. S.; GUIMARÃES, F. F.; DA SILVA, D. B.; SÁNCHEZ, G. P.; LUCHEIS, S. B. Detecção molecular de *Leishmania* Spp. em material de hemocultura, e diagnóstico sorológico para leishmaniose em cães procedentes do bairro da conquista, São Manuel-SP, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 22, n. 4, p. 580-590, 2015.

LEITE, R. S.; FERREIRA, S. D. A.; ITUASSU, L. T.; DE MELO, M. N.; DE ANDRADE, A. S. R. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 201-6, 2010.

LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B.; MONCOL, D. J. Antibody activity to *Babesia canis* in dogs in North Carolina. **Journal of Veterinary Research**, Indore, v. 48, n. 3, p. 339-341, 1987.

LOPES, E. G. **Atributos diagnósticos da reação em cadeia pela polimerase com oligonucleotídeos iniciadores direcionados a genoma de cinetoplasto e nuclear de *Leishmania* spp.** 2010. falta n. de página total. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

LOPES, E. G.; GERALDO JUNIOR, C. A.; MARCILI, A.; SILVA, R. D.; KEID, L. B.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; SOARES, R. M. Performance of conventional PCRs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of *Leishmania* spp. **Revista Instituto Medicina Tropical**, São Paulo, v. 58, p. 41, 2016.

MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, V. R.; VALADÃO, I. F.; BARCI, L. G.; MALHEIROS, E. B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 17-26, 1997.

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. M.; PACHECO, R. S.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; FIGUEIREDO, F. B.; BAPTISTA, C.; MARZOCHI, M. C. Mixed infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.100, p. 442-445, 2006.

MANNA, L. R. S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; FOGLIA MANZILLO, V.; PAVONE, L. M. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 271-280, 2006.

NICOLATTO, R. C.; DE ABREU, R. T.; BOATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; REIS, L. E. S.; CARVALHO, M. G.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; BOUILLET, L. E. M.; LEMOS, D. S.; COURA-VITAL, W.; REIS, A. B. Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in Naturally *Leishmania infantum* – infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. e82947, 2013.

OLIVEIRA, T. M. F. S. **Detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, em soros de cães do Município de Jaboticabal, área não-endêmica para a doença. Jaboticabal, SP. 2004. 45 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2004.**

OLIVEIRA, T. M. F. S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v.17, n.1, p.7-11, 2008.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; MINEO, T. W. P.; BASON, M.; DAY, M. J.; MACHADO, R. Z. IgG subclass profile of serum antibodies to *Leishmania chagasi* in naturally infected and vaccinated dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 162, p.16-22, 2009.

OZBEL, Y.; OSKAM, L.; OZENSOY, S.; TURGAY, N.; ALKAN, M. Z. JAFFE, C. L.; OZCEL, M. A. A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. **Acta Tropica**, v.74, p.1-6, 2000.

PALATNIK DE SOUSA, C.B.; SANTOS, W. R. ; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T. ; REIS, A. B. ; PALATNIK, M. ; MAYRINK, W. ; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, v. 65, n. 5, p.510-517, 2001.

PERREIRA, V. F. ; BENASSI, J. C. ; STARKE-BUZETTI, W. A. ; SILVA, D. T. ; FERREIRA, H. L. ; KEID, L. B. ; SOARES, R. M. ; Ruiz, V. L. de A. ; OLIVEIRA, T. M. F. de S. . Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival swab PCR. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Revista**, v. 49, p. 104-106, 2016.

PILATTI, M. M.; FERREIRA, S. D. A.; DE MELO, M. N.; DE ANDRADE, A. S. R. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. **Research in veterinary science**, v. 87, n. 2, p. 255-7, 2009. Elsevier Ltd.

QUEIROZ, N. M. G. P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; MACHADO, R. Z.; NUNES, C. M.; BUZETTI, W. A. S. Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with RIFI and ELISA-test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 32-38, jan.-mar. 2010.

RANGEL, O.; OLIVEIRA, S. S.; FANÇA, A. C.; CIARAVOLO, R. M.; HENRIQUES, L. F. Leishmaniose visceral no estado de São Paulo: Tendência geral da letalidade entre 1999 a 2013 e o risco de óbitos por estratificação epidemiológica dos municípios e regionais de Vigilância Epidemiológica entre 2011 a 2013. **Boletim Epidemiológico Paulista – BEPA** - 2015;12(143):1-8

RIBEIRO, V. Leishmaniose: sorologia vc imunização. Posso tratar cães? In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 5., 2005, São Paulo. **Anais da COMPAVEPA**, São Paulo: ANCLIVEPA, 2005.

RIBEIRO, R. R. DA SILVA, S. M.; FULÊNCIO, G. O.; MICHALICK, M. S. M.; FRÉZARD, F. J. G. Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. [online]. 2013, vol.22, n.3, pp.373-378.

REY, L. **Parasitologia**. 3ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., p. 214-240, 2001.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4ª ed [reimpr.], Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267-275, 1990.

SANTA ROSA, A. C. I.; OLIVEIRA, S. C. I.; Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.11, 1997.

SÃO PAULO (Estado). Centro de vigilância epidemiológica (CVE), Leishmaniose Visceral Americana Humana. **Casos autóctones e óbitos de LVA, no Estado de São Paulo, 1999 a 2009**. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso em: 16 abr. 2016.

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R.R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A. R.; FRANK, G. R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 104, p. 275-285, 2002.

SHIMABUKURO, P.H.F. 2007. **Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) do estado de São Paulo**. São Paulo, SP: Secretaria de Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, 2007. 121p (Tese, Doutorado, Ciências).

SCHÖNIAN G., NASEREDDIN A., DINSE N., SCHWEYNOCH C., SCHALLIG H.D.F. H., PRESBER W., JAFFE C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 47: 349–358. 2003.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O. Short report: Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **American Journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 65, n.6, p. 896-898, 2001.

SILVA, M. A. L., MEDEIROS R.A., FILHO S.B., MELO L.F., MEDEIROS Z. Alvos moleculares utilizados em pcr para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Vol 7 (3): 01 – 15. 2010.

SILVA, D. T.; BUZETTI, W. A. S.; ALVES-MARTIN, M. F.; PAIXÃO, M.; TENÓRIO, M. S.; LOPRES, M. L. M. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 17-25, 2014.

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 sorology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 139, p. 560-3, 2001

SOUZA, G.D., SANTOS E., ANDRADE FILHO, J.D. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1181-1182, 2009.

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C. L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 9, p. 1729-33, 2004.

TASCA, K. I. et al. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 27-33, 2009.

TÁVORA, M. P. F.; PEREIRA, M. A. V. C.; SILVA, V. L.; VITA, G. F. Comparative validation study between the ELISA and RIFI techniques for diagnosing *Leishmania* sp in stray dogs caught in the municipality of Campos de Goytacazes, State of Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 40(4):482-483, jul-ago, 2007.

TENÓRIO M.S., OLIVEIRA e SOUSA L., ALVES-MARTIN M.F., PAIXÃO M.S., RODRIGUES M.V., STARKE-BUZETTI W.A., ARAÚJO JUNIOR J.P., LUCHEIS S.B. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. **Veterinary Parasitology** 203: 203–206. 2014.

VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the Kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina de São Paulo**, v.38.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT A. Enzyme-linked immunoasorbent assay, p.359-371. In: ROSE, N.; FRIEDMAN, H. (Ed.) **Manual of clinical immunology**. South Carolina: American Society for Microbiology, 1980. 932 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis: situation and trends. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/> Acesso em: 21 jun. 2016.

ZANETTE, M. F. Comparison among enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescence assay and immunochromatography for the diagnosis of canine leishmaniasis. 2006. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.