

VANESSA FIGUEREDO PEREIRA

**Identificação e caracterização de tripanossomatídeos que infectam  
cães em área endêmica para leishmaniose visceral canina**

Pirassununga

2016

VANESSA FIGUEREDO PEREIRA

**Identificação e caracterização de tripanossomatídeos que infectam  
cães em área endêmica para leishmaniose visceral canina**

Tese 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 Doutor em Ciências

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de concentração:**

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

**Orientador:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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 Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3414  
FMVZ

Pereira, Vanessa Figueredo  
Identificação e caracterização de tripanossomatídeos que infectam cães em área endêmica para leishmaniose visceral canina / Vanessa Figueredo Pereira. -- 2016.  
78 f. : il.

Tese (Doutorado) - 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. Dr. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira.

1. *Leishmania infantum*. 2. Cães. 3. Tripanossomatídeos. 4. PCR em tempo real. 5. Suabe conjuntival. I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Identificação e caracterização de tripanossomatídeos que infectam cães em área endêmica para leishmaniose visceral canina", protocolada sob o CEUA nº 6570300616, sob a responsabilidade de **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira e equipe; Vanessa Figueredo Pereira** - 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 15/08/2016.

We certify that the proposal "Identification and characterization of the trypanosomatids infecting dogs in endemic areas for canine visceral leishmaniasis", utilizing 200 Dogs (males and females), protocol number CEUA 6570300616, under the responsibility of **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira and team; Vanessa Figueredo Pereira** - 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 08/15/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07/2016** a **10/2016**

Área: **Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 10 anos**

N: **200**

Linhagem: **SRD**

Peso: **500 a 10000 g**

Resumo: A família Trypanosomatidae é composta de protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida. Dentro desta família se destacam as espécies do gênero Trypanosoma, por parasitarem vertebrados de todas as classes e as espécies do gênero Leishmania que parasitam mamíferos no Velho e Novo Mundo. Estes parasitas possuem ciclos de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados. A maioria das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos que podem pertencer a diversas ordens e famílias. A leishmaniose visceral canina é uma importante zoonose, causada pela *L. infantum* e possui canídeos silvestres e domésticos como importantes reservatórios conhecidos. O cão doméstico é o principal alvo das campanhas de controle da doença em seres humanos por ser a principal fonte de infecção para o vetor no ambiente urbano. O Ministério da Saúde adota testes sorológicos para a detecção de animais positivos; no entanto a sensibilidade e especificidade desses testes são questionáveis. Além das falhas inerentes à qualquer teste diagnóstico, no caso da LVC existem alguns entraves, especialmente pela distribuição geográfica, comum a outras doenças causadas por tripanossomas, e também pela similaridade genética com os outros parasitas da mesma família. Nessas áreas de sobreposição pode haver tanto reação cruzada quanto co-infecção, dificultando a interpretação dos testes. Com a tecnologia da PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR), é possível aumentar a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade da PCR convencional (cPCR). Além de, com esta técnica, ser possível quantificar a carga parasitária presente no animal infectado. Diversos materiais biológicos podem ser utilizados na PCR, diante disso o suabe conjuntival tem se mostrado uma alternativa fácil e prática de se obter amostras biológicas, não invasivas. Trabalhos recentes testaram a eficácia do suabe conjuntival, na detecção da leishmaniose por PCR, e concluíram que sua utilização é de grande valia no diagnóstico da doença. No presente projeto, a utilização da qPCR será avaliada, comparando-a com a RIFI e a cPCR. Além disso será investigado a presença de outros tripanossomatídeos através da cPCR do gene ITS com posterior análise filogenética. Espera-se que, ao comparar as técnicas citadas, obtenha-se um teste de diagnóstico mais preciso e sensível, e também a identificação de outras espécies de tripanossomatídeos infectando cão em área endêmica para LVC.

Local do experimento: As coletas de amostras biológicas foram realizadas no município de Ilha Solteira-SP, durante o mestrado da aluna Vanessa Figueredo Pereira, aprovado pelo CEUA/FMVZ sob o número 2203/2011. As amostras serão analisadas no Laboratório de Medicina Veterinária preventiva Aplicada (ZMV/FZEA/USP). As amostras que serão utilizadas no projeto atual já foram aprovadas pela comissão de ética sob o número descrito acima (2203/2011)

São Paulo, 01 de setembro de 2016



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes  
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

**Nome:** PEREIRA, Vanessa Figueredo

**Título:** Identificação e caracterização de tripanossomatídeos que infectam cães em área endêmica para leishmaniose visceral canina

Tese 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 Doutor em Ciências

**Data:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu pai Cláudio (in memoriam), que aonde quer que esteja deve estar feliz pelo desfecho desta jornada. Pai, você foi um amigo e exemplo maravilhoso de pessoa, pai zeloso e presente, sempre me apoiou em qualquer que fosse a empreitada. Te amarei para todo o sempre.*

*Ao meu marido Kleber, que apesar de pouco tempo de casados, esteve presente no momento de maior dificuldade da minha caminhada, me apoiando, me ajudando superar as dificuldades e fatalidades da vida. Você, meu amor, tem sido meu esteio, sem o qual não conseguiria lidar com tantos obstáculos, obrigada pela força e carinho. Continuaremos a caminhar lado a lado, fortalecendo um ao outro, por toda a vida. Te amo.*

*À minha mãe Adriana e irmã Rafaella, seres iluminados e de muito amor. Agradeço a vocês o exemplo que sempre foram, cada esforço, cada oração, cada conversa, cada carinho. Definitivamente, vocês foram motivadoras e grandes responsáveis por eu ter persistido até o fim. Amo vocês.*

*À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira, orientadora, professora, amiga, e, acima de tudo, o exemplo de profissional e ser humano. Serei eternamente grata pelo suporte técnico, científico e humano/emocional que me sustentaram ao longo desses últimos anos. Meu respeito, admiração e carinho por você crescem continuamente desde o momento em que nos conhecemos.*



## AGRADECIMENTOS

É chegado o momento de registrar todo o meu agradecimento a estes que se mostraram muito importantes ao longo dessa “caminhada”. A tarefa não é fácil, e não por considerar difícil o ato de agradecer, mas por não ter a certeza de possuir a devida sensibilidade. Dedico essas palavras àqueles que se fizeram presentes, direta ou indiretamente nesse período da minha vida.

À Deus, que nos possibilita a vida, nos fortalece e motiva durante nossa jornada.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, FZEA-USP, na qual foram realizados todos os feitos deste trabalho.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, à coordenação do curso de pós-graduação e aos professores pela oportunidade de realizar um sonho.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helena Lage, que esteve presente durante os anos que permaneci em Pirassununga, sempre disposta à contribuir e solucionar entraves relacionados ao presente trabalho e também às conversas e momentos de descontração no laboratório.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pelos esclarecimentos, valiosos para o aprimoramento deste trabalho e pelo belo exemplo de dedicação à pesquisa científica.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lara Borges Keid pela amizade e incondicional ajuda para a realização de meu trabalho.

À Dr.<sup>a</sup> Valéria Lara Carregaro, que participou da qualificação deste trabalho, contribuindo sobremaneira para o aprimoramento do mesmo.

À querida amiga Julia Benassi, sem a qual os meus dias em Pirassununga não teriam o mesmo brilho, uma pessoa linda por dentro e por fora, sempre disposta a ajudar, pronta com uma palavra amiga na ponta da língua. Obrigada pela amizade e convivência maravilhosa.

Ao amigo João Augusto Franco Leonel, como o próprio nome diz Franco, sincero, divertido... sempre disposto a colocar o mundo em ordem, crescente de preferência!!! Querido, mesmo que o tempo passe, e a distância seja uma constante, você ocupa um lugarzinho aqui no meu coração, todo especial.

À amiga Anna Luiza Alencar, como nos divertimos nas nossas comilanças, desabafos e papos cabeça na mesa do bar do chico, desejo do fundo do meu coração que você esteja feliz aí na Dina, mas quando quiser voltar para terrinha, estarei aqui pronta para o próximo açaí. Você mora no meu coração.

Às amigas Jéssica, Bruna e Geovanna, obrigada pela ajuda, apoio e amizade!!! obrigada pelos papos, pelas experiências, pelas festas, pelas dicas, pelas acolhidas. Vocês são muito importantes na minha vida!!!

Ao Gui (Guilherme Scagion), uma pessoinha muito especial, que foi chegando, ocupando seu espaço, sempre respeitando todo mundo, muito educado e gentil!!! Gui obrigada pelas suas delícias na cozinha e pela sua amizade verdadeira e fiel.

Ao Firmezza (Diogo) que me ajudou muito durante a coleta, e na reta final do meu experimento, me deu uma super força no laboratório! Obrigada.

Aos amigos de pós graduação Rapha e Laís, apesar da convivência recente foram muito especiais os momentos compartilhados, obrigada pela cia agradável e diversão no laboratório.

Ao secretário do VPS de São Paulo, Danival, sempre gentil, atencioso e prestativo.

Aos funcionários do campus da USP de Pirassununga, que fazem deste campus um lugar maravilhoso para que todos usufruam.

À Fapesp, pelo Auxílio deste projeto, sem o qual seria inviável a realização do mesmo.

À Cnpq, pela bolsa de doutorado, que ajudou imensamente a financiar o meu custeio pessoal durante esses anos de doutorado.

À bibliotecária Elza Faquim, pela correção das referências bibliográficas e execução da ficha catalográfica.

À todos agradeço profundamente, e dedico o resultado deste trabalho.

## RESUMO

PEREIRA, V. F. **Identificação e caracterização de tripanossomatídeos que infectam cães em área endêmica para leishmaniose visceral canina.** [Identification and characterization of the trypanosomatids infecting dogs in endemic areas for canine visceral leishmaniasis]. 2016. 78f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma grave zoonose, causada pela *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*). O ciclo deste parasito é heteroxeno e a transmissão acontece principalmente pela picada da fêmea do vetor, dípteros da espécie *Lutzomyia longipapis*. O cão doméstico é o principal alvo das campanhas de controle da doença por ser a principal fonte de infecção para o vetor no ambiente urbano. O Ministério da Saúde adota testes sorológicos para a detecção de animais positivos; no entanto a sensibilidade e especificidade desses testes são questionáveis. Além das falhas inerentes a qualquer teste diagnóstico, no caso da LVC existem alguns entraves, especialmente pela distribuição geográfica, comum a outras doenças causadas por tripanossomas, e pela similaridade genética com os outros parasitas da mesma família. Nessas áreas de sobreposição pode haver tanto reação cruzada quanto co-infecção, dificultando a interpretação dos testes. No presente estudo, foram coletadas amostras de suabe conjuntival e sangue de cães em inquérito soroepidemiológico realizado no município de Ilha Solteira - SP. A presença de *Leishmania* spp. e *Leishmania infantum* foram testadas por PCR convencional e PCR em tempo real com *primers* direcionados ao kDNA de *Leishmania* spp. A avaliação sorológica foi realizada através da RIFI, e a identificação e caracterização dos tripanossomatídeos foi realizada através da PCR com *primers* ITS1. A SC-qPCR foi o teste que detectou o maior número de animais. De 204 cães utilizados no estudo, 19,12% (30/204) foram positivos na SC-qPCR. Na SG-qPCR foram 12,74% (26/204) de animais positivos. O teste que detectou o menor número de animais foi a SC-cPCR, com 10,78% (22/204). Enquanto na SG-cPCR obtivemos 13,23% (27/204) animais positivos. De 28 amostras selecionadas para o sequenciamento do gene ITS1, 19 (67,85%) foram 100 ou 99% similares à *L. infantum*, sugerindo que a maioria dos cães positivos para LVC estavam realmente infectados com esta espécie. Entretanto, 2 cães (7,14%), que tiveram suas amostras sequenciadas para tal gene, revelaram 99% de similaridade com *Crithidia fasciculata*. Dos testes avaliados, esses cães foram positivos apenas na SG-cPCR para *Leishmania* spp. Os resultados indicam que a SC-qPCR foi o teste mais eficaz em detectar amostras realmente positivas para *L. infantum*, e que

se deve atentar ao fato de existirem outros tripanossomatídeos infectando os cães em área endêmica de LVC, podendo dificultar o diagnóstico adequado dos animais infectados por *L. infantum*.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*. Cães. Tripanossomatídeos. PCR em tempo real. Suabe conjuntival.

## ABSTRACT

PEREIRA, V. F. **Identification and characterization of the trypanosomatids infecting dogs in endemic areas for canine visceral leishmaniasis.** [Identificação e caracterização de tripanossomatídeos que infectam cães em área endêmica para leishmaniose visceral canina]. 2016. 78f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a serious zoonosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*). The life cycle of this parasite is heteroxenous and the transmission occurs through the bite of the female sandfly, diptera species *Lutzomyia longipalpis*. The domestic dog is the main focus disease control campaigns, since it is the most important source of infection for the vector in urban environment. For positive dogs detection the health ministry uses serological tests, however the sensitivity and specificity of these tests are questionable. In addition to flaws inherent in any diagnostic test, in case of CVL there are some obstacles, especially by geographic distribution, common to other diseases caused by trypanosomes, and also by genetic similarity with other parasites of the same family. In areas of disease overlap, cross-reaction or co-infection may occur, making it difficult to interpret the results. In this study, conjunctival swab samples and whole blood of dogs were collected in seroepidemiological survey conducted in Ilha Solteira - SP. The presence of *Leishmania* spp. and *Leishmania infantum* were tested by conventional PCR and real-time PCR with *Leishmania* spp. kDNA-targeted primers. The serological evaluation was carried out by RIFI, and the identification and characterization of trypanosomatids was performed by PCR with ITS1 primers. SC-qPCR was the test that detected the largest number of animals. Of 204 dogs used in this study, 19.12% (30/204) were positive in SC-qPCR. In SG-qPCR 12.74% (26/204) animals were positive. The test that detected the lowest number of animals was SC-cPCR, with 10.78% (22/204). While in the SG-cPCR we obtained 13.23% (27/204) positive animals. From 28 samples selected for ITS1 gene sequencing, 19 (67.85%) were 100 or 99% similar to *L. infantum*, suggesting that most CVL positive dogs were infected with this species. However, two dogs (7.14%), which had their samples sequenced for the same gene, showed 99% similarity with *Crithidia fasciculata*. From the evaluated tests, these dogs were only positive in SG-cPCR for *Leishmania* spp. The results indicate that SC-qPCR was the most effective test to detect *L. infantum* positive samples, and it should be noted that there are other trypanosomatids infecting dogs in an endemic CVL area, which can difficult to diagnose animals properly infected by *L. infantum*.

Key words: *Leishmania infantum*. Dogs. Trypanosomatids. Real time PCR. Conjunctival swab.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa Município de Ilha Solteira e as principais rotas de acesso ao município.....	33
Figura 2 -	Termociclador de qPCR- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) conectada ao computador - LMSA&SA, FZEA/USP.....	37
Figura 3 -	Organização do locus do rDNA de tripanossomatídeos. Subunidades conservadas: SSU (subunidade menor ribossomal) e LSU(subunidade maior ribossomal). Subunidade variável: ITS1 e ITS2.....	38
Figura 4 -	Gel confeccionado à 2% de agarose, com amostras testadas para o gene kDNA, com os primers 13A e 13B.....	42
Figura 5 -	Curva padrão com diluições seriadas de 5µL de DNA de <i>L. infantum</i> MCAN/BR/1984/CCC-17.481.....	43
Figura 6 -	Curva padrão com diluições seriadas de 1µL de DNA de <i>L. infantum</i> MCAN/BR/1984/CCC-17.481.....	44
Figura 7 -	Gel confeccionado à 1,5% de agarose, com amostras testadas para o gene ITS1, selecionadas para envio ao sequenciamento.....	46
Figura 8 -	Busca de sequências similares às encontradas no presente estudo, através do programa BLASTN, ferramenta de comparação de sequências do GenBank do site NCBI.....	47
Figura 9 -	Árvore filogenética com 20 sequências de nucleotídeos baseada no gene ITS1, construída pelo método de máxima verossimilhança, de acordo com o modelo Tamura-Nei, com 1000 réplicas de bootstrap. O conjunto de dados final contou com 167 posições. A porcentagem de inserção de cada clado analisado está ao lado do ramo. A árvore foi construída no programa MEGA7.....	50

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados nas PCRs de suabe conuntival e sangue dos cães de Ilha Solteira-SP.....	39
Tabela 1 - Distribuição do animais positivos para o gene ITS1 e dentre estes, os selecionados para sequenciamento.....	48
Tabela 2 - Frequência de cães positivos para Leishmania spp, nos diferentes testes avaliados (RIFI, SG-cPCR, SC-cPCR, SG-qPCR e SC-qPCR).....	52



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Porcentagem de animais positivos detectados em cada técnica (SC-cPCR, SC-qPCR, SG-cPCR, SG-qPCR) e suas associações.....	53
--	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>3 OBJETIVO GERAL</b> .....	32
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1 LOCAL DO ESTUDO E POPULAÇÃO AMOSTRADA .....	33
4.2 AMOSTRAS CLÍNICAS .....	34
4.3 AMOSTRA PADRÃO .....	34
4.4 RIFI.....	34
4.5 EXTRAÇÃO DE DNA DE SUABE CONJUNTIVAL E SANGUE .....	35
4.6 CONTROLE ENDÓGENO DAS REAÇÕES DE cPCR E qPCR.....	35
4.7 PCR CONVENCIONAL (cPCR).....	35
4.8 qPCR PARA DETECÇÃO DE <i>L. infantum</i> .....	36
4.9 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA cPCR E qPCR .....	37
4.10 PCR DA REGIÃO ITS1-rDNA .....	37
4.11 SEQUENCIAMENTO .....	39
4.12 ANÁLISE FILOGENÉTICA .....	40
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
<b>5 RESULTADOS</b> .....	41
5.1 AMOSTRAS CLÍNICAS .....	41
5.2 RIFI.....	41
5.3 CONTROLE ENDÓGENO DAS REAÇÕES DE PCR.....	41
5.4 PCR CONVENCIONAL (cPCR).....	42
5.5 VALIDAÇÃO DA qPCR .....	43
5.6 qPCR PARA DETECÇÃO de <i>L. infantum</i> .....	44
5.7 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA cPCR e qPCR .....	45
5.8 PCR DA REGIÃO ITS1-rDNA .....	45
5.9 SEQUENCIAMENTO .....	46
5.10 ANÁLISE FILOGENÉTICA .....	48
5.11 COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DIAGNÓSTICOS .....	50
5.12 COMBINANDO OS RESULTADOS DA qPCR E cPCR .....	52

<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	61
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é um termo global que compreende o conjunto de manifestações clínicas multifacetadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Ocorre endemicamente em 98 países, com cerca de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco e 2 milhões de casos humanos registrados anualmente (MOUTTAKI et al., 2014). Em suas diferentes formas, é a terceira doença vetorial de maior relevância em termos globais, após a Malária e a Filariose, sendo classificada, segundo a Organização Mundial da Saúde, entre as principais doenças negligenciadas, pois atingem a parcela mais desfavorecida da população (REITHINGER; DAVIES, 2002; WHO, 2010, 2014).

O grupo das leishmanias é composto por mais de 30 espécies, das quais 11 têm significativa importância médica e veterinária (CECÍLIO et al., 2014; ELMAHALLAWY et al., 2014). Tais parasitos possuem um complexo ciclo de vida, alternando entre um hospedeiro vertebrado suscetível (mamíferos), e um artrópode vetor permissível (insetos flebotomíneos) (CECÍLIO et al., 2014). Os insetos responsáveis pela transmissão desses parasitos no “Velho Mundo” são flebotomíneos do gênero *Phlebotomous* e, no “Novo Mundo”, do gênero *Lutzomyia*.

O homem e animais domésticos podem ser infectados secundariamente pelas diferentes espécies de *Leishmania* ao estabelecer contato com as áreas florestais ou áreas onde existem tais enzootias. Em decorrência de processos socioambientais particulares e dinâmicos, além dessa transmissão clássica, também se estabeleceram focos de transmissão periurbanos e urbanos veiculados por espécies de flebotomíneos pré-adaptados às novas situações em ambientes alterados (LAINSON; SHAW, 1988; MARZOCHI et al., 2014).

No Brasil, a doença em humanos é dividida em duas formas principais: a Leishmaniose Visceral Americana (LVA), forma mais grave da doença, também conhecida como Calazar, que acomete o sistema mononuclear fagocítico; e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) que pode apresentar desde um envolvimento cutâneo localizado (Leishmaniose Cutânea) até uma destruição de grandes extensões das mucosas (Leishmaniose Mucosa). A primeira forma da doença é causada pela espécie *Leishmania infantum*, também conhecida como *L. (L.) chagasi* ou *L. (L.) infantum chagasi*, enquanto a segunda forma pode ser causada por várias espécies do gênero *Leishmania*, como *Leishmania amazonensis* e *Leishmania brasiliensis* (GONTIJO; CARVALHO, 2003; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; GRIENSVEN; DIRO, 2012).

Em relação à LVA o papel do cão como principal reservatório urbano da doença está bem estabelecido (LARANJEIRA et al., 2014). A estreita convivência do homem com os canídeos domésticos, além das transformações que ocorreram no meio ambiente, como secas prolongadas e periódicas, processo de urbanização, práticas agrárias e condições precárias de habitação contribuíram com a dispersão da doença a partir de focos enzoóticos (MONTEIRO et al., 2005). Segundo Badaró et al. (1996), a doença no cão (Leishmaniose Visceral Canina – LVC), geralmente, precede a ocorrência da doença no homem, sendo que ambas coexistem em todos os focos conhecidos.

Do ponto de vista epidemiológico, a doença canina é considerada mais importante que a doença humana, pois, além de ser mais prevalente, apresenta grande contingente de animais assintomáticos albergando parasitas na derme, com potencial para transmissão da doença (LAURENTI et al., 2013).

Até 1998, não havia referência de casos autóctones de LVC ou humana no estado de São Paulo. Em maio de 1998, foi descrito um foco de LVC no município de Araçatuba, localizado na região Noroeste de São Paulo (LUVIZOTTO et al., 1999). Posteriormente, verificou-se que a LVC não ocorria de forma endêmica somente no referido município, ocorrendo também, em municípios circunvizinhos. Entre 2013 e 2015 foram registrados no estado de São Paulo, 418 casos de LVA, com 39 óbitos (CVE/SP, CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2016).

Apesar das medidas de controle, desenvolvidas pelo Programa de Controle de Leishmaniose Visceral, o número de casos e de óbitos no estado de São Paulo tem se mantido alarmante, havendo inclusive deslocamento para regiões indenes, o que demonstra a importância da doença no estado, bem como a necessidade de pesquisas que possam auxiliar na prevenção e no controle da doença (CVE/SP, CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2015).

Embora a importância dos cães como reservatórios da doença esteja bem estabelecida, não existe nenhum dado oficial sobre o número de cães acometidos no Brasil ou na América do Sul. No Brasil, estima-se em milhões o número de cães infectados (BANETH et al., 2008). Trabalhos científicos publicados apresentam uma prevalência da LVC entre 1,9% a 51,35% em áreas endêmicas do Brasil (FRANÇA-SILVA et al., 2003; DANTAS-TORRES; BRITO; BRANDÃO-FILHO, 2006; MORAIS et al., 2013). Em Ilha Solteira-SP foi encontrada uma prevalência de 12,67% de cães infectados (PEREIRA et al., 2012). Ressalta-se o fato de que, como a prevalência na população canina é maior do que na humana, a identificação de casos

caninos precede os casos humanos (FEITOSA, 2000; BEVILACQUA et al., 2001; MOURA et al., 2009).

No Brasil, os programas de controle da LV do Ministério da Saúde consistem em ações voltadas aos reservatórios, que visam a identificação, o diagnóstico imediato e a eliminação destes animais, com o objetivo de reduzir as fontes de infecção para os flebotomíneos; e o rápido diagnóstico e tratamento dos indivíduos doentes; assim como a borrifação de piretroides nos bairros nos quais há casos humanos, objetivando o controle de vetores.

Nas áreas nas quais ocorre um índice de soropositividade canina de até 1%, recomenda-se uma vigilância epidemiológica e, em regiões em que este índice for maior que 1%, está indicada a eliminação de cães soropositivos e estudos entomoepidemiológicos para determinar a abrangência do problema (BRASIL, 2006).

Diante desse quadro, o cão tem sido o principal alvo das campanhas de controle da doença, uma vez que pode albergar o protozoário silenciosamente como portador assintomático. Com isso, o sucesso da implementação de medidas de controle visa à determinação da prevalência da LVC e localização de focos ativos. Assim sendo, os estudos epidemiológicos são baseados nos sinais clínicos da doença, na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* e/ou na detecção do parasita. Como a grande maioria dos cães infectados é assintomática, o diagnóstico sorológico frequentemente é utilizado para avaliar a prevalência de LVC em grandes populações caninas (GRADONI, 2002).

Entretanto, o impacto da remoção dos cães soropositivos para leishmaniose, no Brasil, tem sido questionado por vários autores devido a sua eficácia dúbia, custo e resistência dos proprietários a aderir ao controle (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001). Reforçando o fato de que essa medida, muitas vezes realizada de forma isolada, não apresentará efetividade para redução da incidência da doença, determinando a necessidade de reavaliação das ações propostas pelo Programa de Controle da LV (LEANDRO JR., 2014).

Os diagnósticos clínico e laboratorial da LVC encontram vários entraves, visto que os sinais clínicos são diversos e similares à outras doenças, variando de assintomáticos à casos com estágio avançado da doença (FEITOSA, 2000; CAMARGO; LANGONI, 2006), incluindo febre intermitente, letargia, onicogribose, emaciação, hepatoesplenomegalia, alterações do apetite, anemia, linfadenopatia e lesões cutâneas, dentre elas a descamação, alopecia, dermatite pustular, dermatose ulcerativa, entre outras (TURREL; POOL, 1982; LONGSTAFFE; GUY, 1986; FERRER et al., 1988; ALMEIDA; OLIVEIRA, 1997).

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).

A detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* através das técnicas sorológicas constitui-se em um instrumento bastante usado no diagnóstico da LVC. Animais doentes que desenvolvem resposta imune humoral podem produzir altos títulos de IgG anti-*Leishmania* (FERRER, 1999). A soroconversão ocorre, aproximadamente, três meses após a infecção, portanto é necessário cautela na interpretação dos resultados, uma vez que podem falhar na detecção de cães recém infectados (FERRER et al., 1995).

Os testes sorológicos são interessantes em inquéritos epidemiológicos pela sua facilidade no diagnóstico de portadores assintomáticos, na confirmação do diagnóstico ou quando existe a suspeita clínica e não foi possível a visualização do parasita no esfregaço sanguíneo (LEVY; BREITSCHWERDT; MONCOL, 1987). O diagnóstico do portador possibilita conhecer o risco do animal ter recaídas em condições de estresse ou infecção concomitante (ODUYE; DIPEOLU, 1976), impedir que o mesmo seja doador de sangue (SANDERS, 1937) e evitar que seja transportado a regiões indenes, pois o animal é um disseminador da doença em potencial, desde que exista o vetor (BREITSCHWERDT et al., 1983).

Até o final de 2011, o ministério da saúde empregava o ensaio imunoenzimático (ELISA BioManguinhos) como teste de triagem e o ensaio de imunofluorescência indireta (RIFI BioManguinhos) como teste comprobatório, no entanto, passou então a utilizar o teste rápido de DPP® (*Dual Path Platform*) como triagem e o ELISA BioManguinhos passou a ser o método comprobatório para o diagnóstico da LVC. A plataforma do DPP® funciona por imunocromatografia. Este é um teste rápido baseado em uma reação coloidal com os antígenos rK26/rK39 que ocorre quando estes se ligam aos anticorpos do hospedeiro. Esta reação dura cerca de 15 minutos e se revelou bastante prática para uso no campo (GRIMALDI JR. et al., 2012).

Em condições experimentais, este teste apresentou alta sensibilidade para cães com sinais clínicos e alta especificidade para cães sem expressão clínica para LVC (GRIMALDI JR. et al., 2012). Entretanto, pesquisas recentes mostraram que, tanto o DPP quanto o ELISA, utilizados pelo Ministério da Saúde no diagnóstico da LVC, podem não ser tão eficazes no diagnóstico de animais assintomáticos ou no início da infecção (FARIA et al., 2015).

Os testes imunocromatográficos que utilizam o antígeno recombinante rK39 em humanos, mostram graus de sensibilidade que variam de 89-98% e especificidade que variam de 97-100% (CARVALHO et al., 2003; CHAPPUIS et al., 2006; SUNDAR et al., 2006; ASSIS et al., 2008; WELCH; ANDERSON; LITWIN, 2008). Em cães, os resultados diferem mais, mostrando graus de sensibilidade que variam de 72 -97,06% e especificidade de 61-100% (REITHINGER et al., 2002; COSTA et al., 2003; METTLER et al., 2005; BISUGO et al., 2007; LEMOS et al., 2008; LIMA, et al., 2010).

Laurenti et al. (2014) considerou em seu trabalho que o DPP® apresentou uma boa performance. Ao comparar o DPP® com os outros testes anteriormente empregados pelo ministério da saúde (RIFI e ELISA BioManguinhos) obteve 90,6% de sensibilidade e 95,1% de especificidade.

Apesar desta mudança no teste de triagem, adotada pelo ministério da saúde, ter contribuído significativamente na diminuição da reação cruzada com outros agentes, uma vez que os antígenos empregados são proteínas recombinantes específicas de *L. infantum*, e anteriormente os antígenos utilizados eram de *L. major*, ainda assim Laurenti et al. (2014) obteve reação cruzada do DPP® em soros de animais infectados com *Babesia canis*.

Segundo Grimaldi Jr. et al. (2012) tanto a sensibilidade quanto a especificidade do teste DPP® estiveram dentro dos intervalos já reportados por outros autores na avaliação de ELISAs com base nos mesmos antígenos, bem como de outros ensaios de *dipsticks* com rK39. Neste estudo relatou também reação cruzada do DPP® com soros derivados de cães com infecção dérmica ativa causada por *L. braziliensis* (mas sem história de exposição potencial a *L. infantum*), fornecendo resultados falso-positivos.

Em um estudo anterior Porrozzi et al. (2007) verificou que essa reação cruzada também ocorre em soros de cães com infecção por *L. braziliensis* ou *L. interrogans*.

Essas provas geralmente apresentam alta sensibilidade e especificidade, no entanto, assim como outros testes, podem gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos, uma vez que a resposta imune pode variar muito de um organismo para ou outro, existindo animais que desenvolvem uma resposta celular eficiente e discreta resposta humoral. Outro ponto que pode interferir é a fase da doença que o animal se encontra no momento da amostragem, podendo ser negativos nos testes sorológicos até 3-4 meses pós-infecção (SLAPPENDEL; GREENE, 1990; FERRER et al., 1995; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; OLIVEIRA et al., 2008).

Outra desvantagem dos testes sorológicos é a possibilidade de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos que podem infectar cães (ALVES et al., 2012). Esse problema se torna ainda mais evidente em regiões onde coexistem leishmania viscerotrópica e dermatrópica



(JESUS et al., 2003). Estudos demonstraram a importância da diferenciação de espécies de *Leishmania*, em especial, devido à ocorrência de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* em áreas endêmicas para *L. infantum* (MADEIRA et al., 2006; GOMES et al., 2007; TOLEZANO, JOSÉ E et al., 2007).

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) vem sendo utilizada há alguns anos em pesquisas sobre diagnóstico de leishmanioses, especialmente por ser mais simples e rápida que outros métodos de biologia molecular e apresentar maior sensibilidade e especificidade (MICHALSKY et al., 2002; VOLPINI et al., 2004). A PCR em tempo real (qPCR), por sua vez, agregou mais robustez à PCR convencional (cPCR), visto que esta metodologia permite amplificação, detecção e quantificação da fluorescência produzida ciclo a ciclo. A qPCR agiliza a obtenção de resultados, economizando tempo e etapas, uma vez que não necessita de eletroforese, minimizando o risco decorrente de possíveis contaminações. Além disso, dependendo da técnica utilizada, é possível aumentar a sensibilidade e especificidade em relação à cPCR, quantificar a carga parasitária presente no animal infectado e identificar as espécies que infectam os animais (NICOLAS et al., 2002; SCHULZ et al., 2003; QUARESMA et al., 2009).

Outra vantagem da qPCR é a capacidade de avaliar a evolução da doença, especialmente em áreas endêmicas, onde grande parte da população canina está exposta ao parasita, mas apenas uma pequena proporção dos cães desenvolve a doença clínica. Portanto, a qPCR torna-se uma ferramenta muito útil nos estudos sobre LVC, permitindo o monitoramento da resposta imune do cão frente à infecção (MARY et al., 2004; FRANCINO et al., 2006; CECCARELLI et al., 2014).

A PCR com amostras de suabe conjuntival vem sendo utilizada no diagnóstico das leishmanioses tanto em animais quanto em humanos. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa utilizaram este tipo de coleta a campo e concluíram que, por ser mais rápido e prático, tal técnica aumentou o número de amostras coletadas em um menor período de tempo, contribuindo para diagnóstico das leishmanioses. Por ser um procedimento pouco invasivo, facilita a amostragem de maior número de animais, assim como causa menos desconforto nos animais durante a coleta, especialmente no caso de cães e gatos (PEREIRA et al., 2012; BENVENGA, 2013; BENASSI, 2015; OLIVEIRA et al., 2015).

A família Trypanosomatidae é composta de vários gêneros de parasitos, os quais compreendem tripanossomatídeos monoxenos, que parasitam insetos como os gêneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, e *Rhyncoidomonas*. Bem como os heteroxenos que parasitam insetos e vertebrados (*Endotrypanum*, *Leishmania*, e *Trypanosoma*)

ou de insetos e plantas (*Phytomonas* sp.). Entre os tripanossomatídeos heteroxenos estão as espécies responsáveis por uma ampla gama de doenças de humanos e animais, tais como o *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*. (MCGHEE; COSGROVE, 1980).

Além de albergar a *L. infantum*, os cães também atuam como importantes reservatórios para outros tripanossomatídeos, como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma caninum* (SAVANI et al., 2005; COELHO et al., 2013).

Esta família é encontrada amplamente distribuída na natureza e podem parasitar cada principal grupo dos eucariotos (MCGHEE; COSGROVE, 1980; VICKERMAN, 1994). Apesar dos tripanossomatídeos que infectam plantas e insetos não serem considerados patogênicos a humanos e animais, vários relatos têm mostrado que eles podem infectar pessoas, particularmente aquelas infectados com HIV (CHICHARRO; ALVAR, 2003; MORIO et al., 2008; GHOSH et al., 2012; SINGH; CHIKARA; SUNDAR, 2013).

Gêneros de tripanosomatídeos de insetos e plantas são informalmente reconhecidos como “tripanosomatídeos inferiores” (SANTOS et al., 2006) essa classificação considerando previamente características morfológicas e de ciclo de vida, atualmente está sendo revista em função dos avanços na sistemática molecular (SANTOS et al., 2006). Esses protozoários dispõem de ampla distribuição geográfica e são de certa forma “promíscuos”, já que, apresentam baixa especificidade à seus hospedeiros invertebrados (PODLIPAEV, 2000), ocasionando dificuldades quanto à identificação morfológica (WALLACE, 1966; PODLIPAEV, 2000, 2001; CATARINO et al., 2001). Embora classicamente não patogênicos ao homem, os “tripanosomatídeos inferiores” tem atraído o interesse como potenciais modelos para o estudo de vários mecanismos biológicos dos Trypanosomatidae.

O compartilhamento de determinantes antigênicos entre tripanosomatídeos é um fenômeno conhecido e descrito desde a década de 60. O trabalho pioneiro de Camargo em 1969 mostrou a presença de imunorreatividade cruzada entre *T. cruzi* e *Leishmania* spp. Especificamente, a imunorreatividade cruzada entre os tripanosomatídeos de interesse médico é de fato bem demonstrada na literatura, atestada por diferentes metodologias de imunodiagnóstico (CAMARGO; REBONATO, 1969; MALCHIODI et al., 1994; VEXENAT; SANTANA; TEIXEIRA, 1996; SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001; MARCIPAR et al., 2005). Principalmente, a utilização de antígenos totais obtidos a partir de extratos de formas de cultivo desses parasitos frequentemente carece de especificidade quando utilizados na discriminação sorológica entre os mesmos, fato que ilustra a extensão do compartilhamento de antígenos entre esses importantes patógenos.

As semelhanças genéticas entre os membros da família Trypanosomatidae tem levado vários pesquisadores a usar tripanossomatídeos não patogênicos para investigar similaridades bioquímicas, celulares e imunológicas entre essas espécies e as espécies patogênicas aos homens e animais, que pertencem aos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* (FERREIRA et al., 2014). Um dos aspectos que podem refletir essa capacidade de infecção e adaptação desses tripanossomatídeos está sem dúvida no repertório molecular que os mesmos apresentam.

Alguns estudos têm demonstrado que os “tripanosomatídeos inferiores” compartilham porção significativa de seu maquinário celular com espécies classicamente patogênicas (SOUZA et al., 1974; SOUZA; MIZUTA; IKEMOTO, 1980; LOPES et al., 1981; BREGANÓ et al., 2003; SANTOS, BRANQUINHA; D’AVILA-LEVY, 2006). Um exemplo dessas semelhanças entre os gêneros desta família se dá nas moléculas de superfície. As glicoproteínas proteolíticas (proteases) apresentam-se bem caracterizadas como moléculas da superfície da membrana dos tripanossomatídeos patogênicos, principalmente a metaloprotease GP63 em *Leishmania* e cisteino-proteinase (cruzipaina) em *T. cruzi*. Grande variedade de proteases homólogas principalmente a GP63 de *Leishmania* foram encontradas amplamente distribuídas nos “tripanosomatídeos inferiores” (NORTH, 1982; MCKERROW et al., 1993; BRANQUINHA et al., 1996; SANTOS et al., 2005). Em 1992, um trabalho pioneiro realizado por Etges mostrou em parasitas dos gêneros *Crithidia* e *Herpetomonas* a presença de metaloproteases de superfície com propriedades bioquímicas similares a GP63 (ETGES, 1992; SANTOS et al., 2006).

Da mesma forma foram caracterizadas metaloproteases extracelulares bioquimicamente homólogas a GP63 com migração eletroforética entre 50 e 100 kDa em vários tripanossomatídeos inferiores como *Phytomonas serpens* (VERMELHO et al., 2003), *Crithidia guilhermei* (D’AVILA-LEVY et al., 2009), *Crithidia fasciculata* (BRANQUINHA et al., 1996), *Crithidia oncopelti* (D’AVILA-LEVY et al., 2009), *Crithidia lucilae* (BRANQUINHA et al., 1996), *Blastocrithidia culicis* (D’AVILA-LEVY et al., 2005) entre outros.

O compartilhamento dessas moléculas provavelmente tem suas bases em pressões seletivas para manutenção de um repertório molecular que favoreça a sobrevivência quando parasitando o hospedeiro inseto, evento comum entre tripanossomatídeos monoxenos e os gêneros de interesse médico (MCGEE; COSGROVE, 1980; FERGUSON, 1997).

Não é surpreendente que na literatura encontram-se relatos de reação sorológica cruzada entre representantes das duas linhagens divergentes dos tripanossomatídeos, os Salivaria, aqueles transmitidos através das glândulas salivares (inoculativa), e os Stercoraria, visto que

estes possuem ampla homologia antigênica entre os diferentes grupos de tripanossomatídeos (MONZON; COLMAN, 1988; DESQUESNES; BOSSENO; BRENIÈRE, 2007).

Esse problema se agrava em regiões de sobreposição de endemias, onde coexistem gêneros de *Trypanosoma* e *Leishmania* infectando animais e seres humanos. Nesse caso, o diagnóstico se torna duplamente dificultado quando realizado pela sorologia, pois o cão/humano pode estar sofrendo infecção mista, ou estar infectado com um agente apenas e apresentar reação cruzada no teste, dificultando a interpretação do resultado. No Brasil, a coinfeção natural de cães domésticos com diferentes espécies de tripanossomatídeos tem sido registrada (ALVES et al., 2012; COELHO et al., 2013).

A importância na detecção e identificação dessas espécies de tripanossomatídeos é reforçada pela demonstração de que diferentes espécies não patogênicas ao homem e aos animais compartilham moléculas homólogas encontradas em tripanossomatídeos classicamente patogênicos, podendo incorrer em reações cruzadas e co-infecções (INVERSO et al., 1993; D'AVILA-LEVY et al., 2003; SANTOS et al., 2006). Desta forma, com o problema da expansão da LV no Brasil e a importância do cão como reservatório da enfermidade em áreas urbanas, fica evidente a relevância da identificação e caracterização dos tripanossomatídeos presentes em regiões endêmicas para LVC, uma vez que o diagnóstico adequado da doença canina é fundamental para seu controle.

## 2 JUSTIFICATIVA

A PCR de suabe conjuntival (PCR-SC), que ou a qual usa um suabe estéril para retirada de amostras de células epiteliais da conjuntiva, tem sido um método alternativo, não invasivo e útil no diagnóstico da LVC. Diversos tipos de espécimes clínicos (incluindo sangue, biópsias de pele, linfonodos, medula óssea e baço) podem ser utilizados para detecção de DNA de *L. infantum*, entretanto, amostras não-invasivas são muito mais desejáveis, uma vez que sua obtenção é menos complexa, não requer mão-de-obra especializada, reduz o desconforto nos animais e facilita a coleta de amostras em massa. Diante dessas facilidades, as variações da PCR com células epiteliais se tornou uma importante fonte de estudo aos pesquisadores de LVC da última década (CECCARELLI et al., 2014).

Este método já foi testado por alguns pesquisadores e mostrou-se altamente sensível no diagnóstico da LVC por PCR em cães sintomáticos e (STRAUSS-AYALI et al., 2004; FERREIRA et al., 2008; PILATTI et al., 2009; GRAMICCIA et al., 2010; LOMBARDO et al., 2012) assintomáticos (LEITE et al., 2010; MUCCIO et al., 2012), além de oferecer rapidez e praticidade na coleta de amostras em inquéritos epidemiológicos (PEREIRA et al., 2016). O suabe conjuntival também foi eficiente na detecção de gatos infectados por *Leishmania* spp. (OLIVEIRA et al., 2015).

Coletas de células epiteliais com suabe oral, nasal e auricular também foram recentemente descritos na literatura como um método considerável na detecção de LVC por PCR (FERREIRA et al., 2013). A presença do parasita também foi detectada em amostras de suabe conjuntival e nasal em humanos sem lesão nasal ou ocular, portadores assintomáticos infectados com *Leishmania (Viannia)* (FIGUEROA et al., 2009).

Outros estudos de pesquisa investigaram o uso da cPCR-SC e qPCR-SC na detecção de leishmanias em felinos e equinos, comparado à RIFI e à PCR de sangue, obtendo sucesso na detecção de *L. infantum* (felinos) e *Leishmania* spp. (equinos). Benvenga (2013) encontrou 66,66% (36/54) de equinos infectados por *Leishmania* spp. através da cPCR-SC, enquanto Benassi (2015) encontrou 12,96% (7/54) positivos na qPCR-SC para *L. infantum*. Em relação aos gatos, Benvenga (2013) encontrou 1,85% (2/108) animais positivos para *Leishmania* spp. pela qPCR-SC, concordando com os resultados obtidos nos mesmos animais positivos pela cPCR-SC. Além disso, Benassi (2015) concluiu que enquanto a qPCR-SG não foi capaz de detectar *Leishmania* spp. em gatos ou equinos, a qPCR-SC foi capaz de detectar o parasito em ambas espécies avaliadas.

Desde a década de 30, com os trabalhos iniciais sobre leishmanioses de Chagas e Deane e Deane, até o presente momento, vários pesquisadores dedicam-se aos estudos sorológicos e, mais recentemente, moleculares de cães com *Leishmania* spp., visando obter métodos de diagnóstico que facilitem a realização de inquéritos epidemiológicos, assim como apresentem melhorias no conhecimento sobre a dinâmica da LV em nosso País. A preocupação deve-se ao fato de que, no Brasil, o cão é encontrado parasitado tanto por espécies de *Leishmania* sp., quanto por espécies de *Trypanosoma* sp., sendo comum o encontro de áreas de sobreposição das LTA e LVA, bem como da doença de Chagas (CHAGAS et al., 1937; LUCIANO et al., 2009; COELHO et al., 2013; MATOS et al., 2015).

Estudos têm relatado a infecção concomitante de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* em humanos provenientes de regiões endêmicas para estas doenças (MATOS et al., 2015). Dada a importância do cão como reservatório doméstico tanto para tripanossomas quanto para *L. infantum*, se faz necessário a identificação correta das espécies de tripanossomatídeos circulantes em regiões com LVC. Da mesma forma, devido à proximidade filogenética, os gêneros da família Tripanosomatidae podem compartilhar de identidade em grande parte do material genético, apresentando moléculas comuns entre os tripanossomatídeos não patogênicos e os de interesse médico, representando uma relação direta com a imunorreatividade cruzada encontrada entre esses tripanossomatídeos (FERREIRA et al., 2014).

Poucos trabalhos têm avaliado de forma crítica essa relação. Tais reações cruzadas, ou até mesmo as co-infecções, podem interferir no diagnóstico mais preciso da LVC. Logo, a identificação eficaz de cães portadores do parasita é de extrema importância, a fim de se evitar o sacrifício desnecessário de cães com diagnóstico falso-positivo, bem como evitar a permanência de cães infectados considerados falso-negativos, servindo de fonte de infecção para os flebotomíneos vetores e auxiliando a disseminação do parasita. Em áreas de sobreposição de endemias, além do diagnóstico ser dificultado, quando realizado pela sorologia, esta sobreposição favorece o aparecimento de infecções mistas e, no Brasil, a coinfeção natural de cães domésticos com diferentes espécies de tripanossomatídeos tem sido registrada.

No presente estudo, um dos oligonucleotídeos utilizados na detecção de *L. infantum*, tanto na cPCR quanto na qPCR, tiveram como DNA alvo, o DNA do cinetoplasto (kDNA) (RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990; FRANCINO et al., 2006).

O cinetoplasto é uma mitocôndria especializada, única dos cinetoplastídeos, que contém DNA extranuclear. O kDNA é uma das peculiaridades mais incomuns desses parasitas. É uma

estrutura única na natureza, uma rede gigante de DNA consistindo de alguns milhares de DNAs circulares que são topologicamente interligados, sendo que cada célula apresenta uma rede de DNA dentro da matriz da sua única mitocôndria. Essa rede contém dois tipos de moléculas de DNA: minicírculos presentes em aproximadamente 10.000 cópias por célula e maxicírculos presentes entre 20 a 50 cópias. Eles são heterogêneos com relação a sequência, mas idênticos em tamanho numa mesma rede; a sua única função conhecida é codificar pequenos RNAs guia que controla o correto processamento ou edição dos transcritos dos maxicírculos (NOYES et al., 1998).

Embora os primers direcionados ao kDNA, utilizados no presente trabalho, sejam da década de 1990, ainda hoje são bastante utilizados na pesquisa sobre leishmaniose no Brasil (ASCHAR et al., 2016).

Particularmente, a natureza repetitiva dos minicírculos os torna um alvo atrativo e frequentemente utilizado para a detecção de *Leishmania* spp. (CÁSSIA-PIRES et al., 2014; MOUTTAKI et al., 2014). São considerados uma ferramenta valiosa no diagnóstico da doença, pois como há uma baixa parasitemia nas amostras biológicas, a sensibilidade da PCR pode ser aumentada utilizando sequências representadas em múltiplas cópias no genoma do parasito. No entanto, o caráter conservador das sequências de kDNA entre espécies de leishmanias poderia representar um problema quando o objetivo é a detecção específica de *L. infantum* (LOSADA-BARRAGÁN et al., 2016).

Alguns autores relataram que, devido à semelhança intraespecífica deste alvo, não alcançaram a amplificação de espécies de leishmania para as quais se destinam, potencialmente amplificando mais de uma espécie (BRETAGNE et al., 2001; MARY et al., 2004; ROLÃO et al., 2004). Embora vários trabalhos utilizando a PCR sejam destinados a detectar especificamente *L. infantum*, a análise in silico mostra que os iniciadores disponíveis podem apresentar reação cruzada (LOSADA-BARRAGÁN et al., 2016).

Além disso, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* são espécies de particular importância epidemiológica no Brasil e podem ser simpátricas em algumas regiões do país (SOUZA et al., 2009; GRIMALDI JR. et al., 2012; ANDRADE et al., 2014). De fato, em algumas regiões epidêmicas do Brasil, foram encontrados cães infectados com *L. braziliensis* (LEÇA JÚNIOR et al., 2015) ou *L. amazonensis* (TOLEZANO et al., 2007).

Diante da hipótese sobre quais possíveis tripanossomatídeos estariam acometendo os cães em área endêmica para LVC outro alvo foi utilizado para investigar as espécies, neste caso, o alvo foi escolhido foi a região ITS1 (*Internal Transcribed Spacer*), a qual está situada entre as subunidades codificadoras do ribossomo (rDNA). O ITS1 fica entre a subunidade 18s e a

subunidade 5.8s, enquanto o ITS2 fica entre as regiões 5.8S e 24S. Tratam-se de regiões não codificadoras e apresentam cerca de 16 de 200 cópias no genoma de *Leishmania*, a região apresenta variação suficiente para permitir a diferenciação das espécies de *Leishmania* (TAI et al., 2001).

Tanto o ITS1 quanto a subunidade menor do gene ribossômico (SSU) tem sido utilizados como marcadores moleculares para inferir relações filogenéticas entre espécies do gênero *Leishmania* e como uma ferramenta confiável para identificação e caracterização de novas espécies (BRIONES et al., 1992; YANG et al., 2010; LIMA, DE et al., 2011; GUAN et al., 2012; AUWERA; DUJARDIN, 2015).

A escolha do gene ITS1 para avaliar as amostras do presente estudo, além do gene kDNA, foi devida à capacidade deste gene mostrar diversidade interespecífica de diversos grupos de tripanossomatídeos (BARNABE; BRISSE; TIBAYRENC, 2003; BRISSE et al., 2003; FERREIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2009; GUAN et al., 2012; LIMA et al., 2012, 2013; FERMINO et al., 2013). Além disso, o produto do ITS1 pode variar de acordo com a espécie, e isso foi interessante no sequenciamento para verificar outras espécies de tripanossomatídeos co-infectando os animais em área endêmica para LVC.

A questão que se coloca frente à situação de eutanásia de animais falso-positivos é a necessidade de aprimoramento das técnicas diagnósticas, principalmente no que concerne à especificidade do teste utilizado para detecção do reservatório animal, uma vez que essa propriedade interfere no valor preditivo positivo do teste. Diante do exposto, espera-se obter com o projeto proposto a identificação e caracterização de tripanossomatídeos que podem estar infectando os cães em áreas endêmicas para LVC, através do sequenciamento gênico e análise filogenética.



### 3 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do nosso estudo foi comparar testes utilizados na detecção de LVC, bem como avaliar a reação cruzada com outros tripanossomatídeos que estão infectando os cães em área endêmica para LVC, em testes moleculares utilizados em estudos sobre a doença.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

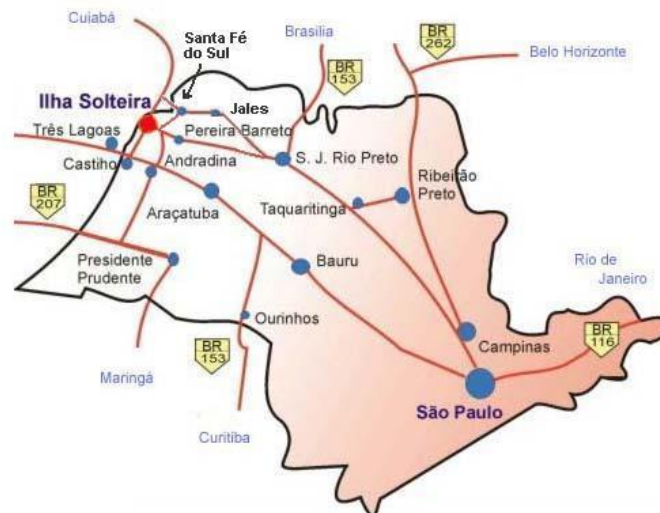
- Comparar a qPCR em relação à cPCR em amostras de sangue, utilizando primers direcionados ao kDNA de *Leishmania* spp.
- Comparar a qPCR em relação à cPCR em amostras de suabe conjuntival, primers direcionados ao kDNA de *Leishmania* spp.
- Comparar os resultados de cPCR de suabe e sangue e qPCR de suabe e sangue frente à RIFI.
- Investigar a presença de tripanossomatídeos infectando cães provenientes de área endêmica para LVC.
- Avaliar por meio de sequenciamento e análise filogenética as espécies de tripanossomatídeos infectando os cães, e a sua relação.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DO ESTUDO E POPULAÇÃO AMOSTRADA

O estudo foi realizado no município de Ilha Solteira, localizado à extremo noroeste do estado de São Paulo - Brasil (latitude 20°25'58" sul e a uma longitude 51°20'33" oeste), considerado endêmico para LVC (Figura 1). As coletas foram do tipo casa à casa, conduzidas em parceria com o Centro de Controle de Zoonoses de Ilha Solteira, durante o inquérito soroepidemiológico realizado no município, pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde. Os cães eram machos e fêmeas, domiciliados, na sua maioria sem raça definida e com idade que variava de 6 meses à 12 anos.

Figura 1- Mapa Município de Ilha Solteira e as principais rotas de acesso ao município



Fonte: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus Ilha Solteira. Disponível em [http://www.feis.unesp.br/?\\_escaped\\_fragment\\_=/servicos/como-chegar/](http://www.feis.unesp.br/?_escaped_fragment_=/servicos/como-chegar/)

## 4.2 AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 204 cães, por punção da veia cefálica, e armazenados à -20°C até o processamento. Também foram coletadas amostras de células esfoliativas da conjuntiva ocular de 204 cães, sendo a coleta realizada em ambos os olhos (totalizando 408 amostras de suabe conjuntival) com auxílio de um suabe estéril. Depois de coletadas as amostras de suabe foram mantidas em microtubos de 1,5ml, secos, mantidos à 4°C até o processamento. As coletas ocorreram no final de julho e início de agosto de 2011.

## 4.3 AMOSTRA PADRÃO

Para a realização da curva padrão da PCR em tempo real (qPCR) e como controle positivo nas reações de PCR convencional (cPCR) foram utilizadas como amostra padrão DNA de cultura de promastigotas de *L. infantum* (MCAN/BR/1984/CCC-17.481), cedida pelo Laboratório de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, extraída no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

## 4.4 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

Para a realização das reações, lâminas para RIFI, contendo antígeno bruto de *L. infantum*, foram gentilmente cedidas pelo laboratório de Imunoparasitologia da FCAV/Unesp, Jaboticabal - SP. A técnica utilizada foi conforme descrito por Oliveira et al (2008). A triagem e titulação das 204 amostras foi realizada, tendo como ponto de corte a diluição de 1:40.

#### 4.5 EXTRAÇÃO DE DNA DE SUABE CONJUNTIVAL E SANGUE

A extração de DNA das amostras de suabe conjuntival foi realizada conforme a técnica descrita por Ferreira et al. (2008) modificada, utilizando fenol-clorofórmio. A técnica de salting-out descrita por John et al. (1991) e modificada por Lahiri; Numberger (1991) foi utilizada para a extração das amostras de sangue.

#### 4.6 CONTROLE ENDÓGENO DAS REAÇÕES DE cPCR E qPCR

Para garantir que os resultados negativos correspondiam a amostras verdadeiramente negativas e não à ausência de DNA, degradação ou inibição da qPCR, o gene beta actina, foi utilizado com controle endógeno conforme descrito por Manna et al. (2006). As reações de qPCR foram conduzidas com o kit FastStart Universal Probe Master (Rox) (Cat#04913949001, Roche, Life Science, Brasil), sob as mesmas condições descritas anteriormente (MANNA et al., 2006).

#### 4.7 PCR CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DE *Leishmania* spp. (cPCR)

A reação de cPCR foi realizada conforme descrita por Rodgers et al. (1990). Os oligonucleotídeos utilizados nesta reação tem como alvo uma região dos minicírculos do cinetoplasto (kDNA). Sendo estes, 13A: (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGG-3') e 13B: (5'-CCCCAGTTTCCCGCCC-3').

A mistura para a reação foi preparada do seguinte modo: 2,5 µL de tampão (200 mM Tris-HCl; 500 mM KCl, pH 8,4), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), 0,5 µL de dNTP's (10 mM cada), 1,5 µL de cada primer (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 com ciclos de Desnaturação Inicial: 94°C (3 min); e 35 ciclos: D: 94°C (40s); A: 56°C (30s); E: 72°C (30s);

E final: 72°C (5 min). O produto final amplificado da reação positiva para *Leishmania* spp. é de 120 pb. Como controle negativo água deionizada estéril.

#### 4.8 VALIDAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

Para validar a eficiência da qPCR descrito por Francino et al. (2006) foi construída uma curva padrão com amostras padrão de DNA genômico de *L. infantum*. Para garantir a repetibilidade do sistema, as análises foram realizadas em triplicata, sendo, o mesmo experimento, repetido três vezes em dias diferentes.

Uma curva padrão externa foi construída, a qual serviu como referência para análise das amostras de campo. Para construção da curva foram utilizados dez pontos, cada ponto correspondeu à uma diluição na base 10 com concentração conhecida de *L. infantum* padrão, medido em espectrofotômetro (NanoDrop2000® Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

#### 4.9 qPCR PARA DETECÇÃO DE *L. infantum*

A reação de qPCR foi realizada conforme descrito por Francino et al. (2006), utilizando uma sonda do tipo TaqMan marcada com duas fluorescências: FAM-TAMRA, tendo como alvo um segmento conservado do minicírculo do cinetoplasto de *L. infantum* (kDNA). Os oligonucleotídeos utilizados foram: LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCAGTTTCCCGCC-3') Para a reação de qPCR foi utilizado o kit LightCycler® 480 Probes Master (Cat no#4887301001, Roche, Life Science, Brasil) em volume 20µL sendo 10µL de 2x concentrado PCR Mix contendo FastStart Taq DNA Polymerase, tampão de reação, dNTP mix e 6,4 nM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 µL de cada oligonucleotídeo (900nM de cada oligonucleotídeo), 0,4 µL de sonda (200nM) e 1 µL de amostra foram utilizados. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador (LightCycler 480 II; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) com ciclos de: 95°C (10 min); 50 ciclos a 95°C por 15s, 50°C por 1 min e 72°C (1s) (Figura 2). 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.

Figura 2 - Termociclador de qPCR- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Manheim, Alemanha) conectada ao computador -LMSA&SA, FZEA/USP



Fonte: (PEREIRA, 2015)

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA cPCR E qPCR

Para estabelecer o limiar de detecção de *Leishmania* spp. dos ensaios de cPCR e de qPCR, amostras de DNA padrão, extraídos de cultura de promastigotas de *L. infantum* (MCAN/BR/1984/CCC-17.481), foram mensuradas em espectrofotômetro (NanoDrop2000® Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). A concentração inicial foi de 32,8ng/uL. As reações de cPCR e qPCR foram realizadas conforme protocolos supracitados com diluições seriadas na base 10, em água ultrapura.

#### 4.11 PCR DA REGIÃO ITS1-rDNA

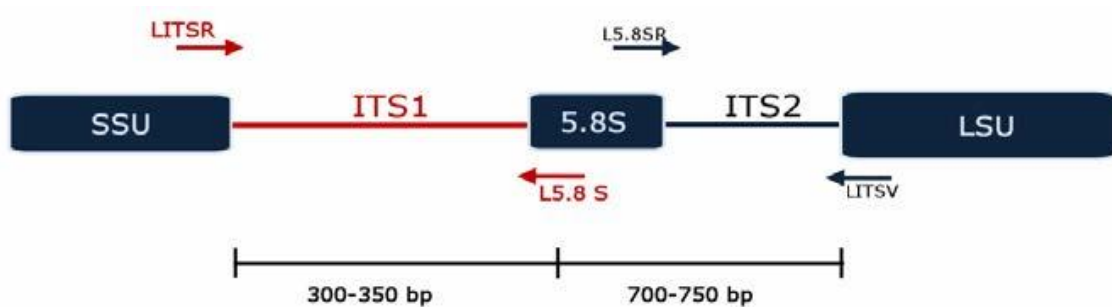
Com o intuito de identificar corretamente as espécies infectando animais positivos nos testes utilizados para detecção de LVC deste trabalho, a PCR da região ITS1 do rDNA foi

realizada de acordo El Tai et al. (2001), nas amostras positivas em pelo menos um dos seguintes testes: RIFI, SC-cPCR, SG-cPCR, SC-qPCR, SG-qPCR.

Os oligonucleotídeos utilizados nessa reação foram: LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'TGATACCACTTATCGCACTT-3'), que se anelam nas seqüências conservadas SSU e 5.8S. Para a mistura da PCR foi utilizado: tampão de PCR (50mM KCl, 10mM de Tris-HCl), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de DNTPs, 2U de Taq-polimerase (Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 400mM de cada iniciador e 5µL da amostra de DNA. Como controle positivo foram utilizadas cepas padrão de *L. infantum* (MCAN/BR/1975/CCC-17.481), *L. braziliensis* (MCAN/BR/1987/CÃO21), *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *Trypanosoma cruzi* (COLTRYP/BR/0324) cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo.

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial em um ciclo de 95°C por quatro minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C durante 30s, 53°C durante 30s e 72°C durante um minuto e uma extensão final de 72°C durante cinco minutos. Os produtos gerados foram de 300 a 500pb, visualizados em gel de agarose a 1,5%. Os oligonucleotídeos utilizados podem ser visualizados no quadro 1.

Figura 3 - Organização do locus do rDNA de tripanossomatídeos. Subunidades conservadas: SSU (subunidade menor ribossomal) e LSU (subunidade maior ribossomal). Subunidade variável: ITS1 e ITS2



Fonte: (PEREIRA et al., 2015)

Quadro 1 – Sequências de oligonucleotídeos utilizados nas PCRs de suabe conuntival e sangue dos cães de Ilha Solteira-SP

Oligonucleotídeos	Sequência	Alvo	Referência
<b>β-ACTIN</b>	Senso: 5'-CTGGCACCACACCTTCTACAA-3' Antissenso: 5'-GCCTCGGTCAGCAGCA-3'	Gene interno – beta actina	MANNA et al. (2006)
<b>13A/13B</b>	Senso: 5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGG-3' Antissenso: 5'-CCCCAGTTTCCCGCCC-3'	kDNA	RODGERS et al. (1990)
<b>LEISH1/LEISH2</b>	Senso: 5'-ACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3' Antissenso: 5'-ACCCCAGTTTCCCGCC-3'	kDNA	FRANCINO et al. (2006)
<b>LITSR/ L5.8S</b>	Senso: 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3' Antissenso: 5'TGATACCACTTATCGCACTT-3'	ITS1 rDNA	EL TAI et al. (2001)

Fonte: (PEREIRA, 2016)

#### 4.12 SEQUENCIAMENTO

Após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, os produtos da PCR com os oligonucleotídeos ITS1 foram retirados do gel e purificados usando o *kit* Ilustra 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 20 ng/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 de Biociências (IB) da Universidade de São Paulo (USP).

Os cromatogramas obtidos com os oligonucleotídeos senso e anti-senso foram montados no software Sequence Scanner 2 v2.2 e submetidas ao BLAST para a recuperação de sequências semelhantes a serem comparadas no Clustal W (disponível no *software* BioEdit Sequence Alignment Editor, versão 7.1.11, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) (Salão 1999). Apenas sequências com mais de 98% de similaridade foram incluídos na análise. As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) utilizando Clustal W no *software* BioEdit



Sequence Alignment Editor versão 7.1.11. 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 a sequência obtida.

#### 4.13 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A história evolutiva das sequências de nucleotídeos foi inferida utilizando a reconstrução filogenética molecular baseada no método estatístico de máxima verossimilhança de acordo com o modelo de substituição de nucleotídeos proposto por Tamura e Nei (1993), com *Bootstrap* de 1.000 réplicas. Todas as posições contendo *gaps* foram eliminadas.

#### 4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A concordância entre os testes diagnósticos foi avaliada utilizando o teste kappa ajustado, com as seguintes definições: nenhuma concordância ( $k < 0$ ), leve concordância ( $0 < k < 0.2$ ), concordância razoável ( $0.2 < k < 0.4$ ), concordância moderada ( $0.4 < k < 0.6$ ), concordância substancial ( $0.6 < k < 0.8$ ) e concordância quase perfeita ( $k > 0.8$ ) (Landis e Koch, 1977). A comparação entre a frequência de animais detectados na cPCR e qPCR, bem como suas associações, foi realizada pelo PROC GLIMMIX do SAS (versão 9.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) utilizando 5% como nível de significância.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram coletadas amostras de sangue e suabe conjuntival de 204 cães provenientes de Ilha Solteira-SP, região endêmica para LVC, durante o inquérito soroepidemiológico realizado no município. No total foram analisadas 816 amostras, sendo 204 de sangue total, 204 de soro, 204 do olho esquerdo e 204 do olho direito.

### 5.2 RIFI

A triagem e titulação das amostras foi realizada conforme descrito por Oliveira et al. (2008), tendo como ponto de corte a diluição de 1:40. Destas 204 amostras, 24 (11,76%) foram consideradas positivas e 180 (88,23%) foram negativas. Na titulação das 24 amostras positivas, 5 cães tiveram o título 40, 3 cães tiveram o título 80, 4 cães tiveram o título 160, 3 cães tiveram o título 320 e 9 cães tiveram o título 640.

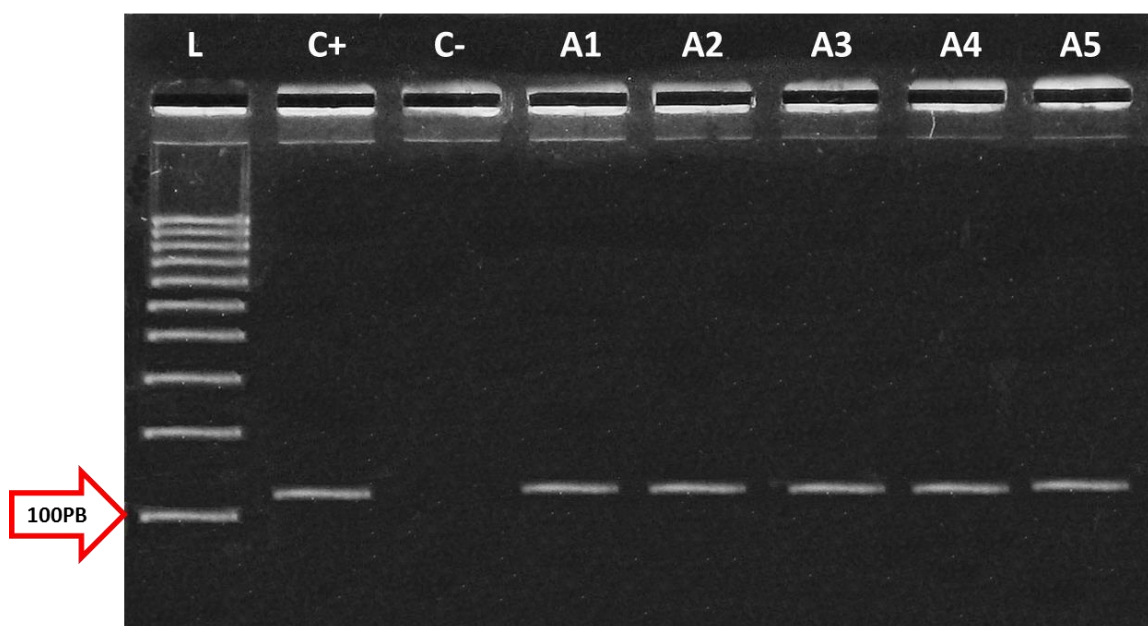
### 5.3 CONTROLE ENDÓGENO DAS REAÇÕES DE PCR

A concentração de DNA canino foi estimada por espectrofotometria a  $\lambda = 260$  e  $280$  nm e nove diluições em série do DNA foram usadas para preparar a curva padrão absoluta, com cada ponto da curva definido por um fator logarítmico. A eficiência da curva foi de 105%, a inclinação da curva (*slope*) obtida foi de -3,20 e o ponto de intersecção no eixo Y de 57,44. Todas as amostras avaliadas foram positivas para o gene interno com um valor de  $Ct < 41,10$ .

#### 5.4 PCR CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DE *Leishmania* spp. (cPCR)

Nesta etapa, realizou-se a cPCR com DNA extraído de suabe conjuntival (cPCR-SC) e de sangue (cPCR-SG). Nos dois tipos de amostra foram seguidos os mesmos protocolos de preparo da mistura para a reação e amplificação. Nas amostras de SC-cPCR o cão foi considerado positivo quando houve reação positiva em pelo menos um dos olhos. Para visualização dos produtos de cPCR, as amostras foram submetidas à corrida em gel de agarose 2%, coradas com brometo de etídeo e visualizadas em transiluminador. Nas amostras positivas houve a amplificação de fragmentos de DNA de 120 pares de base (pb) conservados do minicírculo do cinetoplasto, utilizando-se o par de oligonucleotídeos 13A e 13B para *Leishmania* spp. descrito por Rodgers et al. (1990), o gel pode ser visualizado na figura 4. Dentre os cães avaliados na cPCR com amostras de DNA extraído de suabe conjuntival (SC-cPCR), 10,78% (22/204) foram positivos. Enquanto na cPCR com amostras de DNA extraído do sangue total (SG-cPCR) obtivemos 13,23% (27/204) animais positivos. Seis cães (2,94%, 6/204) foram positivos tanto na SC-cPCR quanto na SG-cPCR. Os cães positivos somente na SC-cPCR foram 7,84% (16/204) e 10,29% (21/204) foram positivos apenas na SG-cPCR. Encontramos 18,14% (37/204) de positividade em uma das duas técnicas isoladamente.

Figura 4 - Gel confeccionado à 2% de agarose, com amostras testadas para o gene kDNA, com os primers 13A e 13B



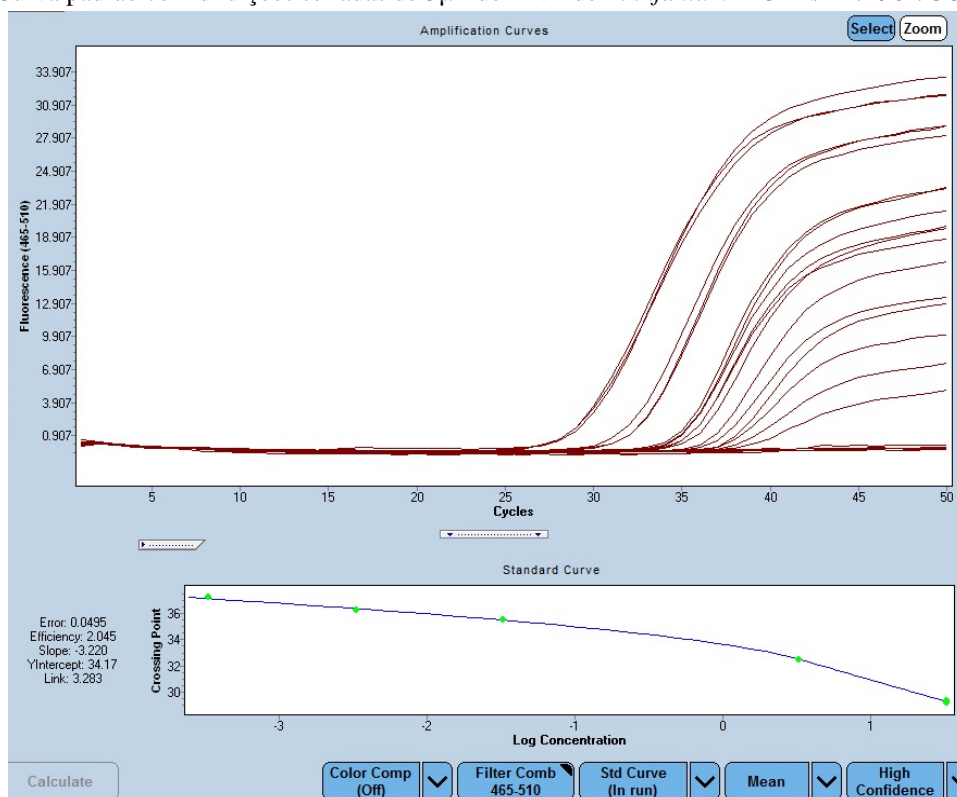
Notas: L: padrão de pares de base, C+: controle positivos (DNA de *L. infantum*), C- :controle negativo, A1 ao A5: amostras de suabe conjuntival dos cães: 01, 04, 07, 08, 11.

Fonte: (PEREIRA, 2016)

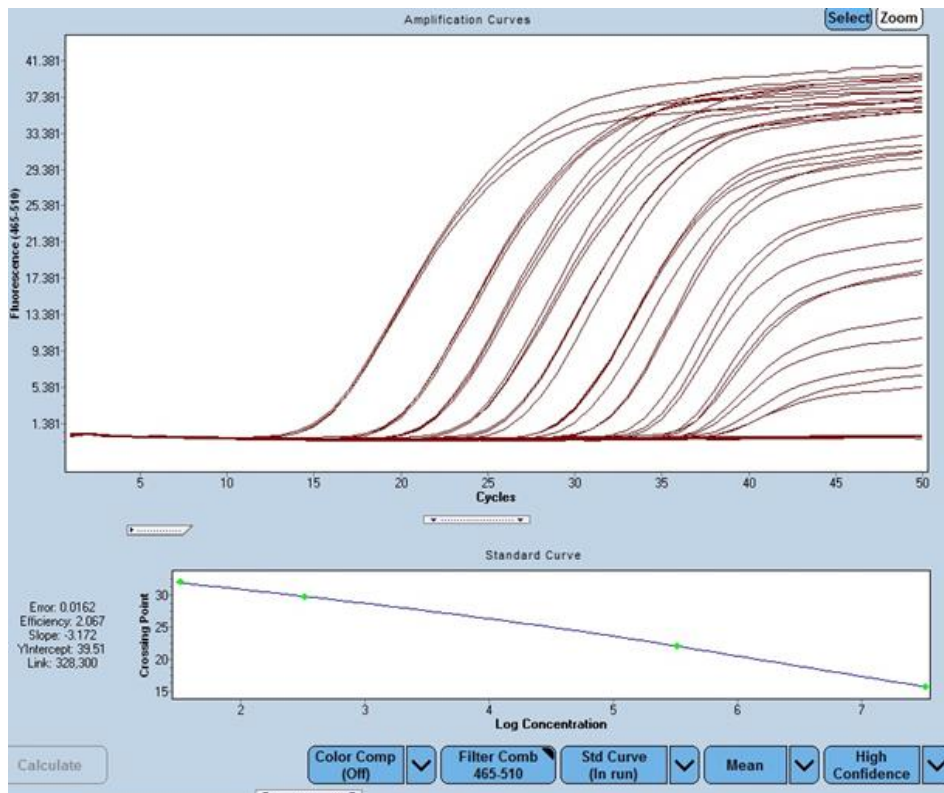
### 5.5 VALIDAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

A eficiência da curva padrão construída para análise das amostras foi de 104%, e a inclinação da curva (*slope*) obtida foi de -3,22 e o ponto de intersecção no eixo Y de 34,17. Para otimizar a quantidade de DNA extraído disponível uma segunda curva padrão foi realizada. Esta curva seguiu o mesmo protocolo de diluição e execução, entretanto, ao invés de 5µl de amostra de DNA, foi utilizado 1µl de amostra. A eficiência foi de 106%, a inclinação da curva (*slope*) foi de -3,17, a intersecção no eixo Y foi de 39,51, e o R2 foi de 0,99. O ciclo de corte do ensaio foi definido baseado no cálculo: média da triplicata da última diluição detectada na curva padrão + 3\*DP (desvio padrão). O teste é válido unicamente se a fluorescência do controle negativo (mix + água sem amostra) for negativo e o controle positivo apresentar um sinal não contestável (Ct<38,59).

Figura 5 - Curva padrão com diluições seriadas de 5µL de DNA de *L. infantum* MCAN/BR/1984/CCC-17.481



Fonte: (PEREIRA, 2016)

Figura 6 - Curva padrão com diluições seriadas de 1 µL de DNA de *L. infantum* MCAN/BR/1984/CCC-17.481

Fonte: (PEREIRA, 2016)

### 5.6 qPCR PARA DETECÇÃO DE *L. infantum*

As amostras de sangue e suabe conjuntival (204 amostras de sangue, 204 de suabe conjuntival do olho direito e 204 de suabe conjuntival do olho esquerdo) dos cães foram submetidas à qPCR em duplicata conforme descrito por Francino et al. (2006), com a finalidade de detectar a presença *L. infantum*.

Dos cães amostrados 19,12% (39/204) foram positivos, com amostras de DNA extraído de suabe conjuntival (SC-qPCR). Na qPCR com amostras de DNA extraído do sangue total (SG-qPCR) obtivemos 12,74% (26/204) de animais positivos. Quatorze (6,86%, 14/204) animais foram positivos na SC-qPCR e SG-qPCR simultaneamente. Vinte e cinco (12,25%, 25/204) cães foram positivos exclusivamente na SC-qPCR, enquanto 5,88% (12/204) animais foram positivos exclusivamente na SG-qPCR. Trinta e sete (18,14%, 37/204) cães foram positivos em uma das duas técnicas.

### 5.7 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA cPCR E qPCR

As reações de cPCR e qPCR, direcionadas ao kDNA de *Leishmania* spp. e *L. infantum* respectivamente, foram realizadas com concentrações que variaram de 32,8ng à 0,0032fg. Como o DNA de uma *Leishmania* spp. tem aproximadamente 50fg (NOYES et al., 1998), e a última concentração detectável foi de 0,032fg, a capacidade de detecção tanto da cPCR quanto da qPCR foi de aproximadamente 0,001 parasita por amostra. Portanto obtivemos o mesma sensibilidade analítica tanto na cPCR quanto na qPCR.

### 5.8 PCR DA REGIÃO ITS1-rDNA

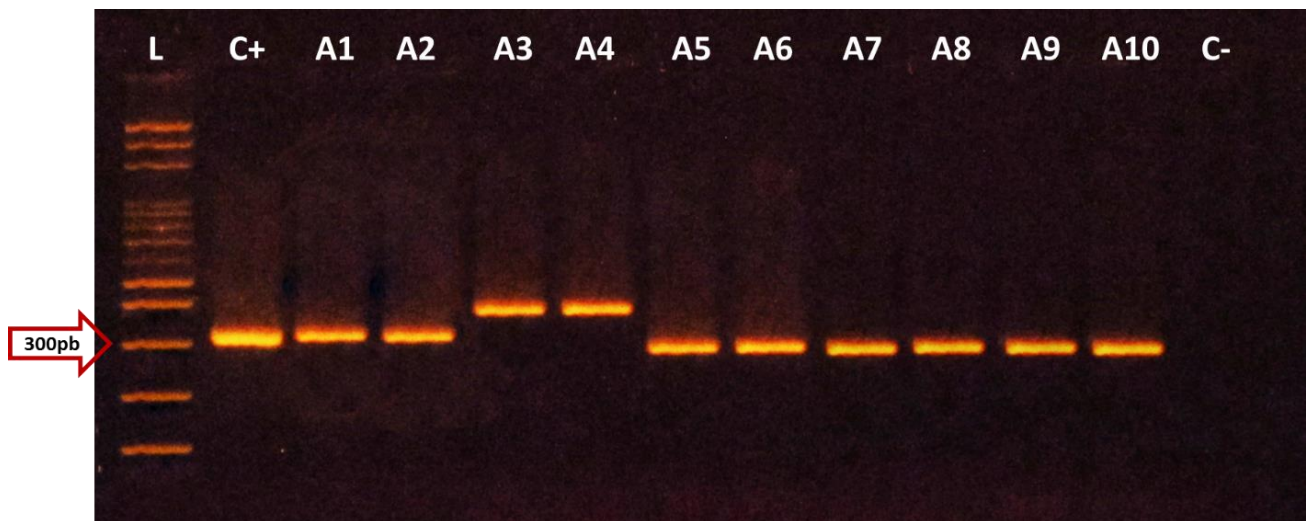
Para o gene alvo da região ITS1 do rDNA foram testadas amostras de 71 cães que foram positivos em pelo menos um dos testes: RIFI, SG-cPCR, SC-cPCR, SG-qPCR, SC-qPCR. De cada animal positivo em um dos testes supracitados foi realizada a PCR do ITS1-rDNA com amostras de suabe conjuntival e sangue, portanto totalizaram 142 amostras testadas pelo gene ITS1.

Dos animais testados 53,52% (38/71) foram positivos e 46,47% (33/71) foram negativas. Desses 38 cães que foram positivos no gene ITS1, 15,78% (6/38) dos cães foram positivos no suabe conjuntival e no sangue simultaneamente. Quinze (44,76%) cães foram positivos apenas no suabe conjuntival, enquanto dezessete cães (44,73%) foram positivos apenas no sangue.

A partir dos resultados obtidos na PCR-ITS1 foram selecionadas 28 amostras para o sequenciamento, a seleção das amostras ocorreram com base na qualidade da banda observada no gel de agarose, sendo as bandas mais fortes selecionadas para o sequenciamento.

Das 28 amostras selecionadas para o sequenciamento 19 apresentaram um padrão de banda de 300pb, 2 apresentaram padrão de banda de 400pb e 7 apresentaram padrão de banda de ~ 500pb. As figuras dos géis são visualizados nas figuras 6 e 7.

Figura 7 - Gel confeccionado à 1,5% de agarose, com amostras testadas para o gene ITS1, selecionadas para envio ao sequenciamento



Notas: L: padrão de pares de base, C+: controle positivos (DNA de *L. infantum*), A1 ao A10: amostras dos cães: 01, 02, 55, 59, 04, 24, 27, 30, 32, 49, C- :controle negativo.

Fonte: (PEREIRA, 2016)

## 5.9 SEQUENCIAMENTO

As sequências obtidas com as amostras dos cães 01, 02, 04, 24, 27, 30, 32, 49, 51, 61, 63, 95, 104, 131, 135, 143 e 199 mostraram 100% de identidade com a sequência de *L. infantum* disponível no GenBank com o número de acesso: KX580706.1 (Figura 8). As sequências identificadas como *L. infantum* eram idênticas, compostas de 273 nucleotídeos, enquanto as duas sequências identificadas como *C. fasciculata* apresentaram 382 nucleotídeos. As amostras 17 e 23 foram 99% semelhantes à *L. infantum* com número de acesso: KX80814.1. As sequências obtidas com as amostras dos cães 55 e 59 apresentaram 99% de identidade com *Crithidia fasciculata* (número de acesso: HM004585.1) e não foram positivas para *Leishmania*.

As sequências com ~500pb foram 99% semelhantes à *Canis familiaris* (número de acesso: AC186069.24)

Figura 8 – Busca de seqüências similares às encontradas no presente estudo, através do programa BLASTN, ferramenta de comparação de seqüências do GenBank do site NCBI

NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information Sign in to NCBI

BLAST® » blastn suite » RID-11KPG1BR014 Home Recent Results Saved Strategies Help

BLAST Results

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

Nucleotide Sequence (273 letters)

RID 11KPG1BR014 (Expires on 10-27 23:42 pm)

Query ID |c|Query\_58551 Database Name nr

Description None Description Nucleotide collection (nt)

Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.5.1+ » Citation

Query Length 273

Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results

Graphic Summary

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence

Color key for alignment scores

- < 40
- 40-50
- 50-80
- 80-200
- >= 200

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Leishmania donovani complex sp. internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, pa	398	398	100%	3e-107	100%	KX710095.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania infantum isolate LMP079 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	398	398	100%	3e-107	100%	KX580706.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania infantum strain MHOM/CN/08/US-1 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	398	398	100%	3e-107	100%	KT153649.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania infantum strain XJR-25 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	398	398	100%	3e-107	100%	KT153648.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania infantum strain GR-6 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	398	398	100%	3e-107	100%	KT153647.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania infantum strain XJR-25-1 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	398	398	100%	3e-107	100%	KT153646.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania infantum strain LS-36 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	398	398	100%	3e-107	100%	KT153645.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania donovani complex sp. isolate MM201521 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna	398	398	100%	3e-107	100%	KT438681.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania donovani complex sp. isolate MM201520 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna	398	398	100%	3e-107	100%	KT438680.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania donovani complex sp. isolate MM201519 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna	398	398	100%	3e-107	100%	KT438679.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania donovani complex sp. isolate MM201516 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna	398	398	100%	3e-107	100%	KT438678.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania donovani complex sp. isolate MM201515 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna	398	398	100%	3e-107	100%	KT438675.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania donovani complex sp. isolate MM201514 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna	398	398	100%	3e-107	100%	KT438674.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania donovani complex sp. isolate MM201512 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna	398	398	100%	3e-107	100%	KT438672.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania donovani complex sp. isolate MM201511 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna	398	398	100%	3e-107	100%	KT438671.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania donovani complex sp. isolate MM201509 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna	398	398	100%	3e-107	100%	KT438669.1

Fonte: (PEREIRA, 2016)



Tabela 1 – Distribuição do animais positivos para o gene ITS1 e dentre estes, os selecionados para sequenciamento

Animal	Testes						Sequenciamento
	ITS1-rDNA	RIFI	SC-cPCR	SC-qPCR	SG-cPCR	SG-qPCR	
1	+	-	+	+	-	+	<i>L. infantum</i>
2	+	+	+	+	+	+	<i>L. infantum</i>
4	+	+	+	+	+	-	<i>L. infantum</i>
17	+	+	-	+	-	-	<i>L. infantum</i>
23	+	+	+	+	-	-	<i>L. infantum</i>
24	+	-	-	+	-	+	<i>L. infantum</i>
26	+	-	-	-	-	+	<i>Canis familiaris</i>
27	+	-	-	-	-	+	<i>L. infantum</i>
30	+	+	-	-	-	-	<i>L. infantum</i>
32	+	-	-	-	-	+	<i>L. infantum</i>
48	+	-	-	-	-	+	<i>Canis familiaris</i>
49	+	+	+	+	-	+	<i>L. infantum</i>
51	+	+	+	+	-	+	<i>L. infantum</i>
52	+	-	-	+	-	-	<i>Canis familiaris</i>
53	+	-	-	+	-	-	<i>Canis familiaris</i>
55	+	-	-	-	+	-	<i>C. fasciculata</i>
56	+	+	-	+	+	-	Não realizado
59	+	-	-	-	+	-	<i>C. fasciculata</i>
61	+	-	-	+	+	-	<i>L. infantum</i>
63	+	-	-	+	-	-	<i>L. infantum</i>
86	+	-	-	-	+	+	Não realizado
87	+	+	+	+	+	-	Não realizado
88	+	-	-	-	+	-	<i>Canis familiaris</i>
91	+	-	-	-	+	-	Não realizado
95	+	-	+	+	+	-	<i>L. infantum</i>
104	+	+	+	+	-	+	<i>L. infantum</i>
108	+	-	-	+	+	-	<i>Canis familiaris</i>
110	+	-	-	-	+	-	Não realizado
112	+	-	-	-	+	-	Não realizado
117	+	-	-	-	+	-	Não realizado
118	+	-	+	+	-	-	Não realizado
128	+	+	+	+	-	+	Não realizado
131	+	+	+	+	-	+	<i>L. infantum</i>
135	+	+	+	+	-	+	<i>L. infantum</i>
143	+	-	+	+	-	+	<i>L. infantum</i>
145	+	-	-	-	+	-	Não realizado
152	+	-	-	-	+	-	<i>Canis familiaris</i>
199	+	+	+	+	-	+	<i>L. infantum</i>

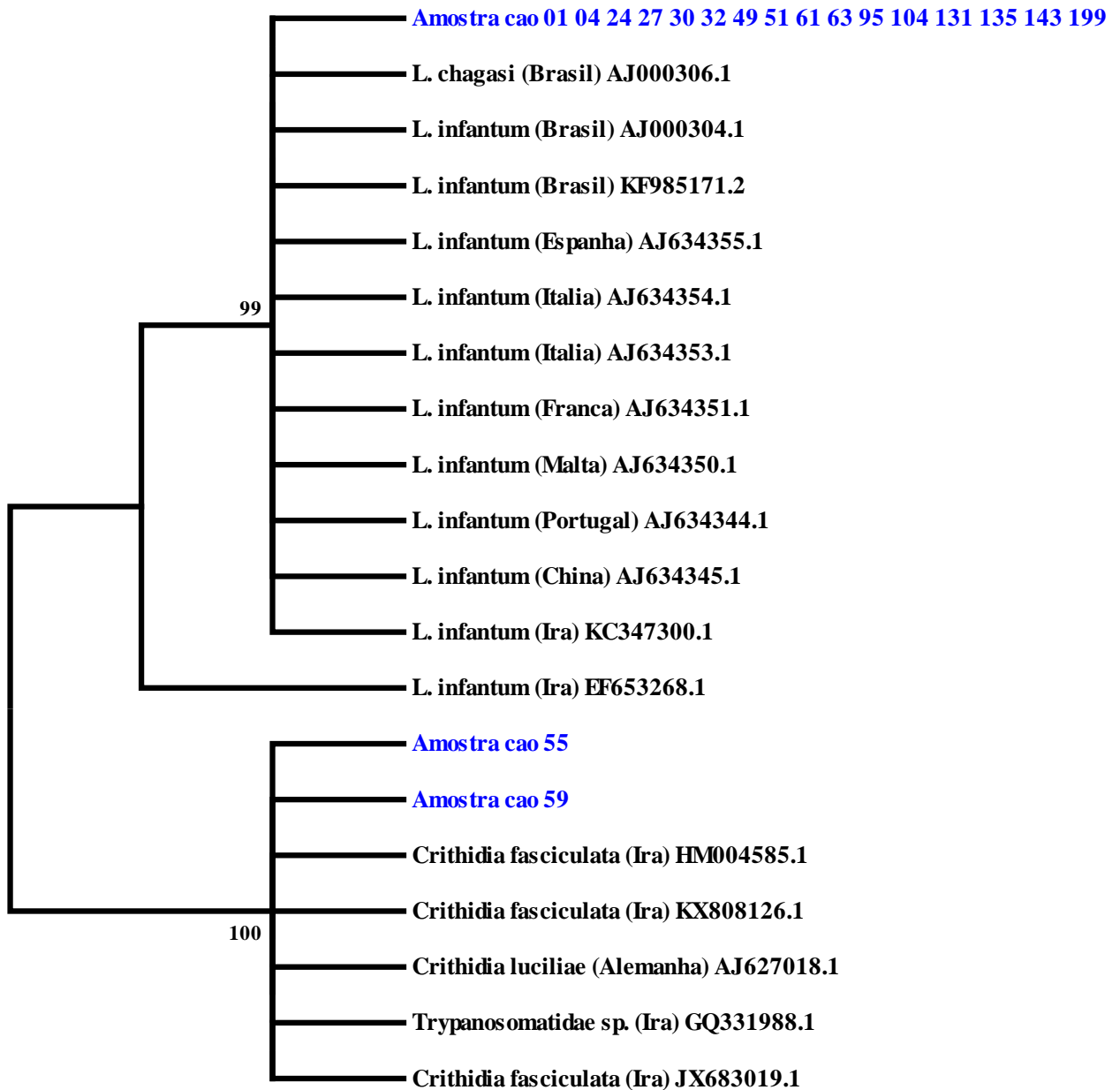
Notas: o sinal (+) indica que animal foi positivo pelo testes, enquanto o sinal (-) indica que o animal foi negativo no teste.

Fonte: (PEREIRA, 2016)

## 5.10 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A história evolutiva foi inferida utilizando o método da máxima verossimilhança baseado no modelo de substituição de nucleotídeos de Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993). A árvore com a maior probabilidade de log (-247.7887) é visualizada na figura 9. A porcentagem em que os táxons associados estão agrupados na árvore são vistos ao lado dos ramos. Árvores iniciais para busca heurística foram obtidas automaticamente pela aplicação dos algoritmos Neighbor-Join e BioNJ para matriz de distâncias entre pares estimada utilizando a abordagem de composição de máxima verossimilhança (*Maximum Composite Likelihood*), selecionando assim, a topologia com valor de log com probabilidade superior. A árvore foi desenhada com o comprimento dos ramos medidos pelo número de substituições por sítio. A análise envolveu 20 sequências de nucleotídeos. Todas as posições contendo lacunas foram eliminadas. A análise evolutiva foi realizada no programa MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Figura 9 - Árvore filogenética com 20 sequências de nucleotídeos baseada no gene ITS1, construída pelo método de máxima verossimilhança, de acordo com o modelo Tamura-Nei, com 1000 réplicas de *bootstrap*. O conjunto de dados final contou com 167 posições. A porcentagem de inserção de cada clado analisado está ao lado do ramo. A árvore foi construída no programa MEGA7



Fonte: (PEREIRA, 2016)

## 5.11 COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DIAGNÓSTICOS

Ao comparar a RIFI com a SG-cPCR, 6 cães (2,94%, 6/204) foram positivos nos dois testes simultaneamente, dezoito cães (8,82%, 18/204) foram positivos somente na RIFI e 21

cães (10,29%, 21/2014) foram positivos somente na SG-cPCR. Quarenta e cinco cães foram positivos em pelo menos uma das técnicas. A concordância entre a RIFI e a SG-cPCR foi de 0,13 revelando uma leve concordância.

Em relação à RIFI comparada à SG-qPCR, 11 cães (5,39%, 11/204) foram positivos nos dois testes simultaneamente, treze cães (6,37%, 13/204) foram positivos somente na RIFI e 15 cães (7,35%, 15/2014) foram positivos somente na SG-qPCR. Trinta e nove cães foram positivos em pelo menos uma das técnicas. A concordância entre a RIFI e a SG-qPCR foi de 0,36 revelando uma concordância razoável entre os testes.

Comparando a RIFI com a SC-cPCR, 14 cães (6,86%, 14/204) foram positivos nos dois testes simultaneamente, dez cães (4,905%, 10/204) foram positivos somente na RIFI e 8 cães (3,92%, 8/204) foram positivos somente na SC-cPCR. Trinta e dois cães foram positivos em pelo menos uma das técnicas. A concordância entre a RIFI e a SC-cPCR foi de 0,56 revelando uma concordância moderada entre os testes.

Ao comparar a RIFI com a SC-qPCR, 17 cães (8,33%, 17/204) foram positivos nos dois testes simultaneamente, 7 cães (3,43%, 7/204) foram positivos somente na RIFI e 22 cães (10,78%, 22/204) foram positivos somente na SC-qPCR. Quarenta e seis cães foram positivos em pelo menos uma das técnicas. A concordância entre a RIFI e a SC-qPCR foi de 0,46 revelando uma concordância razoável entre os testes.

Na comparação entre os dois testes com amostras de DNA de suabe conjuntival (SC-cPCR e SC-qPCR), 20 cães (9,80%, 20/204) foram positivos tanto na SC-cPCR quanto na SC-qPCR, dois cães (0,98%, 2/204) foram positivos somente na SC-cPCR e 19 (9,31%, 19/204) cães foram positivos apenas na SC-qPCR. Quarenta e um cães (20,09%, 41/204) foram positivos no suabe conjuntival em pelo menos uma das técnicas.

Comparando os testes com as amostras de DNA de sangue total (SG-cPCR e SG-qPCR), seis cães (2,94%, 6/204) foram positivos tanto na SG-cPCR quanto na SG-qPCR. Vinte e um animais (10,29%, 21/204) foram positivos exclusivamente na SG-cPCR, enquanto na SG-qPCR foram exclusivamente 20 cães positivos. Quarenta e sete (23,04%, 47/204) cães foram positivos no sangue total em uma das duas técnicas.

A concordância (kappa ajustado) entre os testes de SC-cPCR e SC-qPCR foi de 0,68, indicando concordância substancial. Em relação aos testes SG-cPCR e SG-qPCR, o índice kappa foi de 0,11, o qual revela uma leve concordância entre os testes. Tais dados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Frequência de cães positivos para *Leishmania* spp, nos diferentes testes avaliados (RIFI, cPCR-SG, cPCR-SC, qPCR-SG e qPCR-SC)

Testes		Positivos					Kappa
1	2	1	2	Simultâneo	Total		
SC-cPCR	SC-qPCR	0,98 (2/204)	9,31 (19/204)	9,80 (20/204)	20,10 (41/204)	0,68	
SG-cPCR	SG-qPCR	10,29 (21/204)	9,80 (20/204)	2,94 (6/204)	23,04 (47/204)	0,11	
RIFI	SG-cPCR	8,82 (18/204)	10,29 (21/204)	2,94 (6/204)	22,06 (45/204)	0,13	
RIFI	SG-qPCR	6,37 (13/204)	7,35 (15/204)	5,39 (11/204)	19,12 (39/204)	0,36	
RIFI	SC-cPCR	4,90 (10/204)	3,92 (8/204)	6,86 (14/204)	15,69 (32/204)	0,56	
RIFI	SC-qPCR	3,43 (7/204)	10,78 (22/204)	8,33 (17/204)	22,55 (46/204)	0,46	

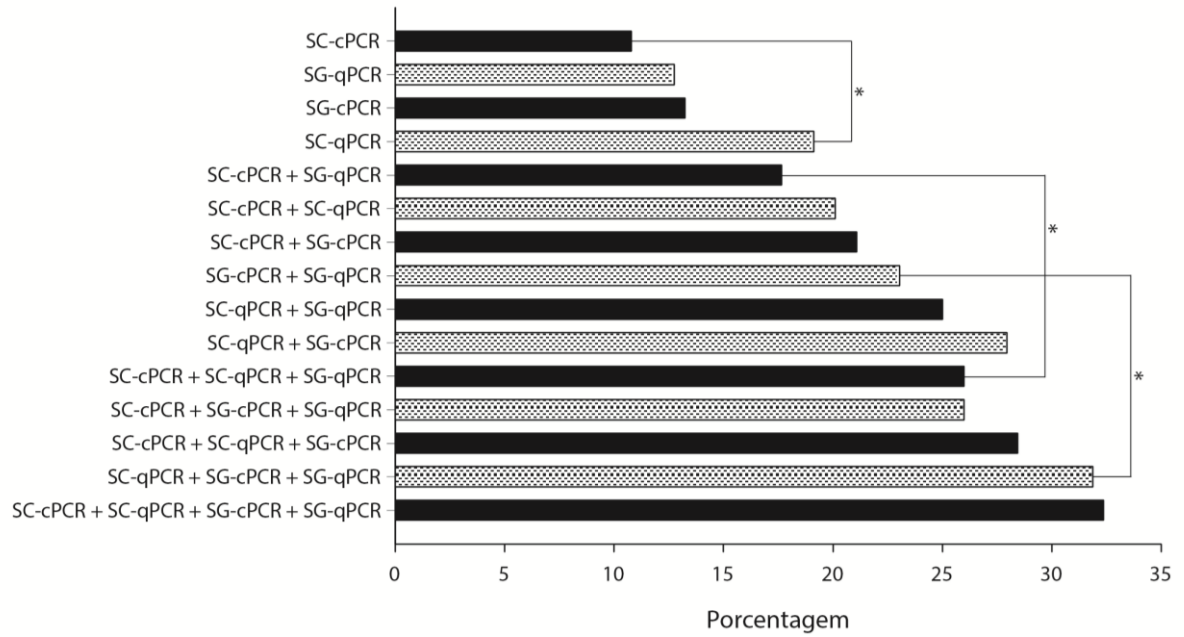
Fonte: (PEREIRA, 2016)

## 5.12 COMBINANDO OS RESULTADOS DA qPCR E cPCR

Devido à dificuldade em alcançar uma sensibilidade satisfatória com apenas uma espécime clínica e também em função da dificuldade em encontrar um método diagnóstico mais eficiente, tendo em vista as variáveis inerentes ao curso da infecção e patogenia da doença, os resultados dos quatro testes (SC-cPCR, SC-qPCR, SG-cPCR, SG-qPCR) foram combinados à fim de se obter melhores resultados.

A SC-qPCR detectou o maior número de animais ( $p < 0,05$ ) em relação à SC-cPCR. A partir da combinação de três testes aumenta o número de animais detectados para LVC quando comparado aos testes isolados. A combinação dos três testes SC-qPCR, SG-cPCR e SG-qPCR foi capaz de detectar 65 (31,86%) cães com LVC, enquanto os testes isolados detectaram em média 28,5 (13,97%) cães. Isso representa um aumento de 128% na detecção da infecção. Ao aumentar a combinação para quatro testes, ou seja, acrescentando o teste SC-cPCR, aumenta a detecção em apenas um animal (0,49%), o que pode justificar o menor número de animais positivos observados nesta técnica (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Porcentagem de animais positivos detectados em cada técnica (SC-cPCR, SC-qPCR, SG-cPCR, SG-qPCR) e suas associações



Notas: Um asterisco (\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os testes especificados.  
 Fonte: (PEREIRA, 2016).

## 6 DISCUSSÃO

A principal medida de controle da LV canina e humana no Brasil é a eutanásia dos cães soropositivos, entretanto para obtenção do sucesso no controle da doença é necessário o diagnóstico adequado dos animais. Apesar de ter sido reformulado pelo ministério da saúde o esquema de detecção de cães com LVC, o qual até 2011, utilizava o ELISA como teste de triagem, e a RIFI como teste confirmatório, e desde então passou-se à utilizarem o teste rápido DPP *kit* (Dual-Path Platform), como triagem e o ELISA como teste confirmatório, este novo sistema possui algumas críticas em relação à sensibilidade e especificidade, bem como a maioria dos métodos utilizados na pesquisas sobre LV (GRIMALDI JR. et al. 2012). Diante desta preocupação o presente estudo buscou comparar testes que são rotineiramente utilizados em pesquisas sobre a doença, e avaliar a presença de reação cruzada com outros tripanossomatídeos infectando cães em área endêmica para LVC, os quais podem dificultar o diagnóstico correto da doença.

Ao comparar os testes diagnósticos empregados neste estudo, algumas discrepâncias foram observadas mesmo quando os testes foram realizados com o mesmo tecido. No caso dos testes com amostra de sangue (SG-cPCR e SG-qPCR), a SG-cPCR detectou um animal a mais em relação à SG-qPCR, na SG-cPCR foram 27 (13,23%, 27/204) animais positivos, enquanto na SG-qPCR foram 26 (12,74%, 26/204) positivos.

Apesar de estudos anteriores sugerirem que amostras de sangue total não serem o tipo de tecido mais adequado para detecção de LVC através de PCR convencional, pois geralmente o número de animais detectados nesta técnica é inferior em relação a outros testes (PAIVA CAVALCANTI et al., 2009; MORAIS et al., 2013), no presente estudo este teste foi capaz de detectar maior número de animais em relação à SC-cPCR, e também detectou um número maior de animais em relação à RIFI.

A justificativa para a SG-cPCR ter detectado um animal a mais em relação à SC-cPCR e três animais a mais em relação à RIFI pode ser explicada pelo fato de que a PCR convencional utilizando o kDNA como alvo ter uma sensibilidade elevada, inclusive parece ser o melhor alvo para detecção de *Leishmania* spp., de acordo com alguns autores, em função deste conter cerca de 10.000 cópias de DNA circular por protozoário (LACHAUD et al., 2002; STRAUSS-AYALI et al, 2004; MOHAMMADIHA et al., 2013). Assim sendo, no caso deste trabalho, este alvo pode ter funcionado melhor na SG-cPCR, ao contrário do que já foi relatado por

Mohammadiha et al. (2013), o qual obteve melhores resultados com a SG-qPCR, utilizando também o kDNA.

No caso dos testes com amostras de suabe conjuntival ocorreu o inverso, a SC-qPCR detectou maior número de animais em relação à SC-cPCR. Dos cinco testes analisados, a SC-qPCR foi o teste que detectou o maior número de cães positivos para LVC (19,11%, 39/204), em contrapartida, a SC-cPCR foi teste que obteve a menor frequência de animais positivos, com 10,78% (22/204). Este resultado é próximo ao encontrado por Lombardo et al. (2012), que utilizando o mesmo alvo (kDNA), obteve 22,1% de cães positivos em uma área endêmica da Itália. Ceccareli et al. (2014) relatou a SC-qPCR como uma boa ferramenta para detectar animais positivos para LVC que estão no limite inferior de detecção (*borderline*) na RIFI, e que também teve maior sensibilidade e especificidade em relação à qPCR com papa de linfócitos. Solcà et al. (2012), ao contrário dos autores supracitados encontrou uma sensibilidade maior da cPCR frente à qPCR, utilizando amostras de aspirado esplênico. Mohammadiha et al. (2013) considerou que a qPCR apresenta vantagens em relação à outros testes como cPCR e teste de aglutinação direta (DAT), por ser mais sensível e permitir a detecção de LVC em animais assintomáticos.

Comparado aos outros testes, a RIFI detectou maior número de animais apenas em relação à SC-cPCR, sendo que a RIFI detectou 24 cães com *Leishmania* spp. e a SC-cPCR detectou 22 cães infectados. No município de Ilha Solteira há relatos de 7,1% a 14,5%, de soroprevalência pela RIFI, dependendo da região (PAULAN et al., 2012). De forma semelhante, no presente estudo, foram obtidos 11,76% (24/204) de cães positivos, corroborando com o relato supracitado. Já na região denominada “Cinturão Verde”, assentamentos rurais no entorno do município, foi descrita uma soroprevalência de 31,25% de LVC (SPADA et al., 2014). Os autores atribuem este alto nível de infecção às condições do entorno das habitações, como presença de lixo, matéria orgânica, vegetação nativa, criação de animais, além de ser próximo à um canil municipal, no qual foi relatado 89% dos cães portadores de LVC (SILVA et al., 2014).

Embora, neste estudo, a sensibilidade analítica tenha sido a mesma tanto para cPCR quanto para qPCR, a SC-qPCR detectou um maior número de animais infectados ( $p < 0,05$ ) em relação à SC-cPCR. Acredita-se que a maior capacidade de detecção de cães infectados pela SC-qPCR esteja realmente associada às vantagens inerentes a esta técnica. Visto que, dos 22 animais detectados na SC-cPCR, 20 foram detectados pela SC-qPCR, com uma concordância de 0,68, considerada substancial. Esta questão da sensibilidade analítica ter sido igual, pode ser explicada pelo fato dos testes terem sido realizados em condições laboratoriais, onde a amostra



padrão foi diluída em água, em fator logarítmico na base 10, podendo não ser capaz de mimetizar o comportamento de uma amostra biológica de campo.

Autores tem descrito sobre a superioridade diagnóstica da qPCR em relação à cPCR (FRANCINO et al., 2006; MOHAMMADIHA et al., 2013). Posto que a qPCR é uma técnica mais sofisticada e precisa (pois a leitura é feita eletronicamente), necessita menos da manipulação humana, podendo assim diminuir os riscos de contaminação e reações falso positivas da cPCR. Dentre suas vantagens, estão maior sensibilidade, rapidez e reprodutibilidade. Além da possibilidade de acompanhar a evolução da doença através da quantificação da carga parasitária (MORAIS et al., 2013).

Outro pressuposto que contribui para confirmação da superioridade diagnóstica da SC-qPCR, foi que tanto na cPCR quanto na qPCR utilizou-se o kDNA como alvo, uma vez que o protocolo descrito por Francino et al. (2006) utiliza os mesmos oligonucleotídeos descrito por Rodgers; Popper e Wirth (1990), e mesmo assim a qPCR foi capaz de detectar um maior número de animais em relação à cPCR. Vale ressaltar que a adaptação da qPCR a partir da cPCR supracitadas, contou com adição da sonda de hidrólise, a qual pode ter contribuído para melhoria da técnica e com o aumento expressivo na detecção.

Embora a parasitemia com menos de 1 parasita/ml seja inferior ao teórico limiar detectável, presente em uma amostra clínica submetida à extração, resultados semelhantes foram descritos em amostras humanas (MARY et al., 2004; FRANCINO et al., 2006). No presente estudo, detectamos uma quantidade ainda menor de parasitos, o limite de detecção foi de 0,001 parasita por reação. Isso pode ser devido à presença de DNA residual do parasita que persistiu dentro de macrófagos após a destruição do parasita (MARY et al. 2004).

Somando-se ao fato do teste com amostras de suabe conjuntival apresentar melhores resultados quando comparado aos outros tecidos, tem a questão de que amostras não-invasivas são muito desejáveis, já que sua obtenção é menos complexa, não requer mão-de-obra especializada e facilitaria a coleta em massa de amostras caninas. Como o presente estudo foi conduzido juntamente com o inquérito municipal, pôde-se ter uma ideia de como seria uma coleta na prática, utilizando o suabe conjuntival em larga escala. A forma de armazenamento do suabe também foi simples, uma vez que as amostras foram mantidas a 4°C até o momento da extração de DNA.

No sequenciamento utilizou-se o gene ITS1, o qual se trata da região não codificada entre as região ribossômicas 18S e 5.8S, a fim de buscar diversidade interespecífica e intraespecífica e inferir relações filogenéticas entre possíveis espécies de leishmanias infectando cães em área endêmica para LVC bem como outras coinfeções com

tripanossomatídeos. Como a região ITS1 é bastante variável é uma ferramenta útil para identificação e caracterização de novas espécies. O sequenciamento das 28 amostras revelou que a maioria dos protozoários (60,71%, 17/28) infectando os cães eram 100% similares com *L. infantum*, duas amostras (7,14%, 2/28) foram 99% similares à *L. infantum*, e 7,14% (2/28) foram 99% foram similares à *C. fasciculata*, 25,00% (7/28) sequencias foram 100% similar à *Canis familiaris*.

Das dez amostras que não foram selecionadas para o sequenciamento, devido à qualidade da banda apresentada no gel de agarose, sete amostras apresentaram o padrão de banda semelhante às que foram identificados como *L. infantum*, com aproximadamente 300pb. Portanto, sugere-se que estas amostras sejam *Leishmania* spp.

As outras três que não foram enviadas ao sequenciamento, pelo mesmo motivo apresentaram padrão de bandas semelhante ao encontrado nas amostras que foram identificadas como *Canis familiaris*, com aproximadamente 500pb. As amostras que foram identificadas como *C. fasciculata* apresentaram um padrão de banda de 400pb aproximadamente, por isso sugere-se que estas três amostras sejam *Canis familiaris* e não *C. fasciculata*.

O ITS1 como alvo foi utilizado por outros autores tanto para diferenciar cepas de leishmania de uma mesma região, quanto para identificar espécies de tripanossomas (YANG et al., 2010; TENÓRIO et al., 2014). O sequenciamento deste gene detectou *L. infantum* semelhantes a outros isolados do Brasil e de outros países, e também detectou *C. fasciculata*, espécie de tripanossomatídeo, parasita de culicídeos, a qual poderia estar atuando como fator de confusão no diagnóstico de LVC. A hipótese mais óbvia para detecção de *C. fasciculata* nestes cães, é que este protozoário habita o aparelho digestivo de culicídeos, e pode ter infectado os cães no repasto sanguíneo. Inclusive, há relatos de infecção por tripanossomatídeos monoxenos em humanos imunossuprimidos, com quadro semelhante à LV (JIMÉNEZ et al., 1996; PACHECO; MARZOCHI; PIRES, 1998; BOISSEAU-GARSAUD et al., 2000).

Considerando que os dois cães que apresentaram 99% de similaridade com *Crithidia fasciculata* no sequenciamento foram positivos exclusivamente na SG-cPCR, a questão intrigante diante dos resultados, é se esta reação está detectando apenas *Leishmania* spp. ou pode estar detectando outros tripanossomatídeos.

Outro fato que reforça a possível reação cruzada com outros tripanossomatídeos na SG-cPCR foi a discordância entre os animais positivos na SG-cPCR e SG-qPCR, 21 animais foram positivos exclusivamente na SG-cPCR enquanto 20 positivos exclusivamente na SG-qPCR. A concordância entre a SG-cPCR e a SG-qPCR foi de 0,11, considerada uma leve concordância, uma vez que apenas 6 animais foram positivos nos dois testes simultaneamente.

Portanto, sugere-se que a frequência de detecção pela SG-cPCR esteja associada à capacidade do teste em detectar outros tripanossomatídeos presente no sangue do animal, como *Crithidia*, por exemplo.

Relatos de reação cruzada entre *Leishmania* e *Crithidia* são descritos desde 1982, quando (SEHGAL; AIKAT; PATHANIA, 1982) usou *Crithidia luciliae* como antígeno do diagnóstico de LV humana e observou que não teve nenhuma diferença entre o substrato de *C. luciliae* e de *L. infantum* na detecção pela RIFI.

Em relação à filogenia da família dos tripanossomatídeos, a *Crithidia fasciculata* é considerada como proximamente relacionada com espécies dos gêneros *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Leptomonas* e *Wallaceina* (BORGHESAN, 2013). Esses protozoários do gênero *Crithidia* (LÉGER, 1902) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) são parasitas exclusivos de insetos, não sendo patogênicos ao homem ou animais. Particularmente, a *Crithidia fasciculata* pode infectar várias espécies de mosquitos, principalmente culicídeos (ALCOLEA et al., 2014).

López-Brea (1983) também utilizou antígeno de *Crithidia* sp. como antígeno para diagnóstico de LV humana com sucesso. Ferreira et al. (2014) cita que as afinidades entre os membros da família Trypanosomatidae tem levado os pesquisadores à investigar sobre a biologia, imunologia e bioquímica dessas espécies não patogênicas como modelo para os membros patogênicos como tripanossoma e leishmania.

Inclusive na comunidade médica vem se pesquisando há algum tempo sobre a possibilidade da utilização de antígenos heterólogos provenientes de tripanossomatídeos não patogênicos, como a *Crithidia fasciculata*, para o diagnóstico sorológico de infecções causadas por espécies patogênicas (FERREIRA et al., 2014). Além disso, a facilidade de cultivo dos mesmos, menor risco, pouca exigência técnica e baixo custo tem estimulado seu estudo, e os tem estabelecido como organismos modelo (SANTOS et al., 2006).

Saraiva (2015) em sua tese de doutorado encontrou, em Minas Gerais, fêmeas de flebotomíneos das espécies *Evandromyia sallesi* e *Psathyromyia lutziana* infectados por *C. fasciculata*. As amostras foram sequenciadas e apresentaram 100% de similaridade com *C. fasciculata*. Este achado pode contribuir para elucidação de como se deu a infecção dos cães, utilizados neste estudo, por *C. fasciculata*. Diante disso, sugere-se que a transmissão aos cães pode ter ocorrido durante o repasto sanguíneo, e como estes protozoários não tem tanta especificidade por hospedeiro, pode ter se mantido durante um período na corrente sanguínea.

Outra observação, que corrobora com as explanações acima, é que a concordância da SG-qPCR foi maior com a RIFI e com a SC-qPCR do que a concordância da SG-cPCR com a

SG-qPCR. A concordância entre a RIFI e a SG-qPCR foi de 11 cães (5,39%, 11/204), bem como a concordância da SC-qPCR com a SG-qPCR foi de 14 animais (6,86%, 14/204) positivos simultaneamente. Sugerindo, assim, que a SG-qPCR pode apresentar maior especificidade em relação à SG-cPCR.

De acordo com trabalhos anteriores, nenhum teste diagnóstico, que utilizado isoladamente, pode detectar perfeitamente todos os animais infectados (GRADONI, 2002; ASSIS et al., 2010). Tendo em vista os problemas inerentes a cada técnica combinamos os resultados dos testes realizados, a fim de verificar a possível contribuição dessa combinação no diagnóstico da doença. Ao se combinar três testes moleculares, independentemente do tecido, como por exemplo: cPCR-SC, qPCR-SC e qPCR-SG, ou PCR-SC, cPCR-SG e qPCR-SG, a capacidade de detecção foi maior ( $p < 0,05$ ) em relação à qualquer técnica isolada. Quando a combinação dos testes é qPCR-SC, cPCR-SG e qPCR-SG, a frequência detectada mais que dobrou em relação aos testes isolados, de 28,5 cães detectados em média, sobe para 65 cães detectados.

Aschar et al. (2016) também encontrou um aumento significativo ao combinar os testes em relação à cada teste isolado. Neste caso eles avaliaram o potencial da qPCR com amostras de suabe oral (SO-qPCR) frente à SC-qPCR e RIFI na detecção de *L. infantum*. A combinação dos três testes aumentou em 30% a detecção de LVC em cães assintomáticos, em relação à SO-qPCR isoladamente. A combinação de testes diagnósticos pode ser interessante quando cada teste detecta melhor uma fase da doença. Podendo assim, diminuir a quantidade de animais falso negativos negligenciados. De acordo com Aschar et al. (2016), a combinação dos três testes pode detectar 95,2% de cães sintomáticos, e 83,3% de cães assintomáticos. Neste estudo eles utilizaram 92 cães infectados com *L. infantum*.

Ressalta-se o fato que, no caso deste estudo, deve-se atentar em relação a quais testes serão combinados, no tocante à possibilidade de reação cruzada, como ocorreu com a SG-cPCR, que detectou *C. fasciculata* no sangue dos cães. Portanto a combinação dos testes deve levar em consideração essa possibilidade e ter cautela na escolha dos testes.

Neste estudo, a inferência filogenética foi realizada pelo método de máxima verossimilhança, seguindo o modelo proposto por Tamura e Nei (1993), este método foi utilizado no intuito de apresentar a melhor topologia, uma vez que leva em consideração a soma das probabilidades. Na análise foram incluídas 38 sequências de nucleotídeos, sendo 21 amostras dos cães utilizados neste estudo, e 17 sequências recuperadas da base de dados do GenBank, no site NCBI. As sequências selecionadas apresentaram 98% ou mais de similaridade com as sequências obtidas neste trabalho.

As amostras que foram semelhantes à *L. infantum*, permaneceram no mesmo clado, assim como ocorreu com as amostras similares à *C. fasciculata*.

Assim como descrito por outros autores (TAI et al., 2001; YANG et al., 2010; TENÓRIO et al., 2014) o gene ITS1 foi relevante na caracterização das espécies que estavam acometendo os cães em Ilha Solteira – SP, região endêmica para LVC. Das 19 amostras caracterizadas como *L. infantum*, a maior parte das amostras (84,21%, 16/19) eram positivas na SC-qPCR, seguido pela SG-qPCR e SC-cPCR que tinham 12 (63,15%) cães positivos nestes testes. Na RIFI, dos 19 cães, 11 foram positivos por este teste, (57,89%), e por último a SG-cPCR, que teve 4 cães dos 19, positivos neste teste.

Diante do exposto, os dados apresentados neste trabalho reforçam a eficiência da SC-qPCR em detectar LVC em cães provenientes de região endêmica para a doença, podendo ser uma ferramenta em áreas de risco, aonde muitas vezes a infecção é subestimada. Além de apresentar uma aplicação prática, podendo ser utilizado juntamente com outros testes, ajudaria na confirmação do diagnóstico, principalmente no Brasil aonde a prática da eutanásia é a principal medida de controle utilizada.

Com base em tudo o que foi discutido, fica claro que o diagnóstico molecular associado a amostras clínicas não invasivas tem grande potencial de aplicabilidade na triagem de cães. Além disso, o desempenho verificado destas amostras biológicas no diagnóstico da LVC por qPCR também abrem perspectivas para o uso em larga escala em humanos. O presente trabalho pode ser considerado como um subsídio para a realização de estudos de campo em maior escala, com a finalidade de verificar a validade destas amostras obtidas por meio de suabe para o diagnóstico da LVC em um contexto epidemiológico.

O presente estudo também abriu uma nova perspectiva sobre a reação cruzada com outros tripanossomatídeos na detecção de LVC por cPCR com amostras de sangue. Pela primeira vez foi descrito o tripanossomatídeo *C. fasciculata* infectando cães em área endêmica para LVC. Neste sentido se fazem necessários estudos mais aprofundados sobre esse tipo de reação cruzada e em quais circunstâncias ocorre, pois esse tipo de reação pode interferir no diagnóstico adequado da doença.

Em suma, a combinação dos testes diagnósticos avaliados neste estudo podem ser um recurso auxiliar importante para o diagnóstico da LVC e vir a ser parte do repertório de opções a serem escolhidas para esta finalidade.

## 7 CONCLUSÕES

- A SG-cPCR detectou um animal a mais em relação à SG-qPCR, entretanto a concordância entre os testes foi leve ( $\kappa$ : 0,11);
- Apesar da SG-cPCR ter detectado maior número de animais em relação à SG-qPCR, SC-cPCR e RIFI, isto provavelmente deve-se à reação cruzada com outras espécies.
- Na comparação entre as cinco técnicas, a capacidade de detecção da SC-qPCR foi superior à outras técnicas utilizadas;
- Foi detectada a espécie *Crithidia fasciculata*, tripanossomatídeos não patogênicos, infectando cães em área endêmica para LVC.
- A utilização do PCR convencional com amostras de sangue total pode apresentar reação cruzada com outro tripanossomatídeo.
- Usar técnicas combinadas, como SG-cPCR, SG-qPCR, SC-qPCR pode ser uma alternativa na detecção de LVC, uma vez que nenhuma técnica é cem por cento sensível e específica.

## REFERÊNCIAS

AKTER, S.; ALAM, M. Z.; NAKAO, R.; YASIN, G.; KATO, H.; KATAKURA, K. Molecular and Serological Evidence of Leishmania Infection in Stray Dogs from Visceral Leishmaniasis-Endemic Areas of Bangladesh. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 4, p. 795–799, 2016.

ALCOLEA, P. J.; ALONSO, A.; GARCÍA-TABARES, F.; TORAÑO, A.; LARRAGA, V. An insight into the proteome of Crithidia fasciculata choanomastigotes as a comparative approach to axenic growth, peanut lectin agglutination and differentiation of Leishmania spp. promastigotes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–26, 2014.

ALMEIDA, I. C.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, v. 2, p. 11, 1997.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

ALVES, A. S.; MOUTA-CONFORT, E.; FIGUEIREDO, F. B.; OLIVEIRA, R. V. C.; SCHUBACH, A. O.; MADEIRA, M. F. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by Trypanosoma caninum. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 3, p. 1329–33, 2012.

ANDRADE, A. R. O.; SILVA, B. A. K.; CRISTALDO, G.; ANDRADE, S. M. O. DE; FILHO, A. C.; RIBEIRO, A.; CUNHA SANTOS, M. DA; ANDREOTTI, R. Spatial distribution and environmental factors associated to phlebotomine fauna in a border area of transmission of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 260, 2014.

ASCHAR, M.; OLIVEIRA, E. T. B. DE; LAURENTI, M. D.; MARCONDES, M.; TOLEZANO, J. E.; HIRAMOTO, R. M.; CORBETT, C. E. P.; MATTA, V. L. R. DA. Value of the oral swab for the molecular diagnosis of dogs in different stages of infection with Leishmania infantum. **Veterinary Parasitology**, v. 225, p. 108–113, 2016.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. DE C. V.; NUNES, C. M.; OLIVEIRA, T. M. F. DE S.; JUNIOR, A. C. F. DE N.; NEVES, M. F.; MACHADO, R. Z.; BUZETTI, W. A. S. Comparative study of diagnostic methods for visceral leishmaniasis in dogs from Ilha Solteira, SP. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 19, n. 1, p. 17–25, 2010.

ASSIS, T. S. M. DE; BRAGA, A. S. DA C.; PEDRAS, M. J.; BARRAL, A. M. P.; SIQUEIRA, I. C. DE; COSTA, C. H. N.; COSTA, D. L.; HOLANDA, T. A.; SOARES, V. Y. R.; BIÁ, M.; CALDAS, A. DE J. M.; ROMERO, G. A. S.; RABELLO, A. L. T. Validation of the rapid immunochromatographic test IT-LEISH® for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 2, p. 107–116, 2008.

AUWERA, G. VAN DER; DUJARDIN, J.-C. Species typing in dermal leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 265–94, 2015.

BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, M. C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J. M.; HOUGHTON, R. L.; DAVID, J. R.; REED, S. G. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 3, p. 758–61, 1996.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–30, 2008.

BARNABE, C.; BRISSE, S.; TIBAYRENC, M. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of subgenus *Schizotrypanum* based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide sequence analyses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 2, n. 3, p. 201–208, 2003.

BENASSI, J. C. **Detecção de *Leishmania* spp. por PCR em tempo real em amostras de suabe conjuntival de cães, gatos e equinos**. 2015.74f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2015.

BENVENGA, G. U. **Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos no Estado de São Paulo**. 2013.101f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2013.

BEVILACQUA, P.; PAIXÃO, H.; MODENA, C.; CASTRO, M. Urbanization of visceral leishmaniose in Belo Horizonte, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 1, p. 1–8, Feb. 2001.

BISUGO, M.; ARAÚJO, M. DE F. L.; TANIGUCHI, H. H.; CUNHA, E. A.; SANTOS, A. A.; JUNIOR, M. S.; KANETO, C.; CAMARGO, C. V. O.; POLIZEL, M. A.; VIGILATO, M.; NEGREIROS, C. M. S.; OKAGIMA, M.; GONÇALVES, N. M.; LUNDSTEDT, L. P.; ANDRADE, A. M.; LIMA, V. M. F.; TOLEZANO, J. E. Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 2, n. 2, p. 185–193, 2007.

BOISSEAU-GARSAUD, A. M.; CALES-QUIST, D.; DESBOIS, N.; JOUANNELLE, J.; JOUANNELLE, A.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P. A new case of cutaneous infection by a presumed monoxenous trypanosomatid in the island of Martinique (French West Indies). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 1, p. 51–2, 2000.

BORGHESAN, T. C. **Diversidade e Filogenia de tripanossomatídeos parasitas de dípteros**. 2013. Universidade de São Paulo, 2013.



BRANQUINHA, M. H.; VERMELHO, A. B.; GOLDENBERG, S.; BONALDO, M. C. Ubiquity of Cysteine- and Metalloproteinase Activities in a Wide Range of Trypanosomatids. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 131–135, 1996.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1. ed. Brasília - DF: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BREGANÓ, J. W.; PICÃO, R. C.; GRAÇA, V. K.; MENOLLI, R. A.; ITOW JANKEVICIUS, S.; FILHO, P. P.; JANKEVICIUS, J. V. *Phytomonas* serpens, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 39, n. 3, 2003.

BREITSCHWERDT, E. B.; MALONE, J. B.; MACWILLIAMS, P.; LEVY, M. G.; QUALLS, C. W.; PRUDICH, M. J. Babesiosis in the Greyhound. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 182, n. 9, p. 978–82, 1983.

BRETAGNE, S.; DURAND, R.; OLIVI, M.; GARIN, J. F.; SULAHIAN, A.; RIVOLLET, D.; VIDAUD, M.; DENIAU, M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 4, p. 828–31, 2001.

BRIONES, M. R.; NELSON, K.; BEVERLEY, S. M.; AFFONSO, H. T.; CAMARGO, E. P.; FLOETER-WINTER, L. M. *Leishmania tarentolae* taxonomic relatedness inferred from phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 53, n. 1–2, p. 121–7, 1992.

BRISSE, S.; HENRIKSSON, J.; BARNABÉ, C.; DOUZERY, E. J. P.; BERKVENS, D.; SERRANO, M.; CARVALHO, M. R. C. DE; BUCK, G. A.; DUJARDIN, J.-C.; TIBAYRENC, M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. **Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 173–83, 2003.

CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impact of leishmaniasis on public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 527–548, 2006.

CAMARGO, M. E.; REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 4, p. 500–5, 1969.

CAMARGO-NEVES, V. American Visceral Leishmaniasis in the state of São Paulo: current situation. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 48, p. 12–14, 2007.

CARVALHO, S. F. G.; LEMOS, E. M.; COREY, R.; DIETZE, R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 3, p. 321–4, 2003.

CÁSSIA-PIRES, R.; BOITÉ, M. C.; D'ANDREA, P. S.; HERRERA, H. M.; CUPOLILLO, E.; JANSEN, A. M.; ROQUE, A. L. R. Distinct Leishmania Species Infecting Wild Caviomorph Rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. e3389, 2014.

CATARINO, L. M.; SERRANO, M. G.; CAVAZZANA, M.; ALMEIDA, M. L.; KANESHINA, E. K.; CAMPANER, M.; JANKEVICIUS, J. V.; TEIXEIRA, M. M. G.; ITOW-JANKEVICIUS, S. Classification of trypanosomatids from fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 201, n. 1, p. 65–72, 2001.

CECCARELLI, M.; GALLUZZI, L.; SISTI, D.; BIANCHI, B.; MAGNANI, M. Application of qPCR in conjunctival swab samples for the evaluation of canine leishmaniasis in borderline cases or disease relapse and correlation with clinical parameters. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 460, 2014.

CECÍLIO, P.; PÉREZ-CABEZAS, B.; SANTARÉM, N.; MACIEL, J.; RODRIGUES, V.; CORDEIRO DA SILVA, A. Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 480, 2014.

CHAGAS, E.; CUNHA, A. M. DA; CASTRO, G. DE O.; FERREIRA, L. C. Leishmaniose Visceral Americana (Nova entidade morbida do homem na America do Sul): relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 32, n. 3, p. 321–389, 1937.

CHAPPUIS, F.; RIJAL, S.; JHA, U. K.; DESJEUX, P.; KARKI, B. M. S.; KOIRALA, S.; LOUTAN, L.; BOELAERT, M. Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in rural Nepal. **Tropical Medicine & International Health : TM & IH**, v. 11, n. 1, p. 31–40, 2006.

CHICHARRO, C.; ALVAR, J. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97 Suppl 1, p. 75–8, 2003.

COELHO, W. M. D.; APOLINÁRIO COELHO, J. C.; TEIXEIRA, W. F. P.; COELHO, N. M. D.; OLIVEIRA, G. P.; LOPES, W. D. Z.; CRUZ, B. C.; MACIEL, W. G.; SOARES, V. E.; BRESCIANI, K. D. S. Detection of co-infections by Leishmania (l.) chagasi, Trypanosoma evansi, Toxoplasma gondii and Neospora caninum in dogs. **Ars Veterinaria**, v. 29, n. 3, p. 169, 2013.

COSTA, R. T. DA; FRANÇA, J. C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; GENARO, O.; CAMPOS-NETO, A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 6, p. 678–82, 2003.

CVE/SP, CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO, D. DE Z. Número de casos de Leishmaniose no Estado de São Paulo. São Paulo,

SP, 2015.

D'AVILA-LEVY, C. M.; VOLOTÃO, A. C. C.; ARAÚJO, F. M.; JESUS, J. B. DE; MOTTA, M. C. M.; VERMELHO, A. B.; SANTOS, A. L. S.; BRANQUINHA, M. H. *Bodo* sp., a free-living flagellate, expresses divergent proteolytic activities from the closely related parasitic trypanosomatids. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 454–458, 2009.

D'AVILA-LEVY, C. M.; SILVA, B. A.; HAYASHI, E. A.; VERMELHO, A. B.; ALVIANO, C. S.; SARAIVA, E. M. B.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S. Influence of the endosymbiont of *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia deanei* on the glycoconjugate expression and on *Aedes aegypti* interaction. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, n. 2, p. 279–86, 2005.

D'AVILA-LEVY, C. M.; SOUZA, R. F.; GOMES, R. C.; VERMELHO, A. B.; BRANQUINHA, M. H. A metalloproteinase extracellularly released by *Crithidia deanei*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 10, p. 625–32, 2003.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E. F. DE; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1–2, p. 54–60, 2006.

DESQUESNES, M.; BOSSENO, M.-F.; BRENIÈRE, S. F. Detection of Chagas infections using *Trypanosoma evansi* crude antigen demonstrates high cross-reactions with *Trypanosoma cruzi*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 4, p. 457–62, 2007.

ELMAHALLAWY, E. K.; SAMPEDRO MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ-GRANGER, J.; HOYOS-MALLECOT, Y.; AGIL, A.; NAVARRO MARI, J. M.; GUTIERREZ FERNANDEZ, J. Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 8, p. 961–72, 2014.

ETGES, R. Identification of a surface metalloproteinase on 13 species of *Leishmania* isolated from humans, *Crithidia fasciculata*, and *Herpetomonas samuelpessoai*. **Acta Tropica**, v. 50, n. 3, p. 205–217, 1992.

FARIA, A. R.; CASTRO VELOSO, L. DE; COURA-VITAL, W.; REIS, A. B.; DAMASCENO, L. M.; GAZZINELLI, R. T.; ANDRADE, H. M. Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum*-Infected Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e3429, 2015.

FEITOSA, M. M. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 28, p. 36–44, 2000.

FERMINO, B. R.; VIOLA, L. B.; PAIVA, F.; GARCIA, H. A.; PAULA, C. D. DE; BOTERO-ARIAS, R.; TAKATA, C. S. A.; CAMPANER, M.; HAMILTON, P. B.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 313, 2013.

FERREIRA, L. R.; KESPER, N.; TEIXEIRA, M. M. G.; LAURENTI, M. D.; BARBIERI, C. L.; LINDOSO, J. A.; UMEZAWA, E. S. New insights about cross-reactive epitopes of six trypanosomatid genera revealed that *Crithidia* and *Leptomonas* have antigenic similarity to *L. (L.) chagasi*. **Acta tropica**, v. 131, p. 41–6, 2014.

FERREIRA, R. C.; SOUZA, A. A. DE; FREITAS, R. A.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S. A.; BARRETT, T. V.; SHAW, J. J.; TEIXEIRA, M. M. G. A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 427–35, 2008.

FERREIRA, S. D. A.; ITUASSU, L. T.; MELO, M. N. DE; ANDRADE, A. S. R. DE. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR–hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3–4, p. 257–263, 2008.

FERREIRA, S. DE A.; ALMEIDA, G. G.; SILVA, S. DE O.; VOGAS, G. P.; FUJIWARA, R. T.; ANDRADE, A. S. R. DE; MELO, M. N. Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 4, p. e2150–e2150, 2013.

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **The Veterinary Record**, v. 136, n. 20, p. 514–6, 1995.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona, Espanha, **Anais...** Barcelona, Espanha, 1999. p. 6–10.

FERRER, L.; RABANAL, R.; FONDEVILA, D.; RAMOS, J. A.; DOMINGO, M. Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29, n. 6, p. 381–388, 1988.

FIGUEROA, R. A.; LOZANO, L. E.; ROMERO, I. C.; CARDONA, M. T.; PRAGER, M.; PACHECO, R.; DIAZ, Y. R.; TELLEZ, J. A.; SARAVIA, N. G. Detection of *Leishmania* in Unaffected Mucosal Tissues of Patients with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia)* Species. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 4, p. 638–646, 2009.

FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T. DA; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; COSTA, C. A. DA; MAYRINK, W.; VIEIRA, E. P.; COSTA, J. S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 2–3, p. 161–73, 2003.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3–4, p. 214–221, 2006.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 1993.202f. Tese (Doutorado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1993.

GHOSH, S.; BANERJEE, P.; SARKAR, A.; DATTA, S.; CHATTERJEE, M. Coinfection of *Leptomonas seymouri* and *Leishmania donovani* in Indian leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 2774–8, 2012.

GOMES, A. H. S.; FERREIRA, I. M. R.; LIMA, M. L. S. R.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.; ARAÚJO, M. F. L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 3–4, p. 234–241, 2007.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. DE. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION. PROCEEDINGS OF THE 2ND INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2002, Boxmeer, The Netherlands, **Anais...** Boxmeer, The Netherlands: INTERVET INTERNATIONAL BV, 2002. p. 7–14.

GRAMICCIA, M.; MUCCIO, T. DI; FIORENTINO, E.; SCALONE, A.; BONGIORNO, G.; CAPIELLO, S.; PAPANCONTE, R.; FOGLIA MANZILLO, V.; MAROLI, M.; GRADONI, L.; OLIVA, G. Longitudinal study on the detection of canine *Leishmania* infections by conjunctival swab analysis and correlation with entomological parameters. **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 3–4, p. 223–228, Aug. 2010.

GRIENSVEN, J. VAN; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309–22, 2012.

GRIMALDI JR., G.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; SANTOS, C. B. DOS; PINTO, I. DE-S.; DE-AZEVEDO, C. T.; 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, n. 1, p. 54–9, 2012.

GUAN, W.; CAO, D.-P.; SUN, K.; XU, J.; ZHANG, J.; CHEN, D.-L.; CHEN, J.-P. Phylogenetic analysis of Chinese *Leishmania* isolates based on small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) and 7 spliced leader RNA (7SL RNA). **Acta Parasitologica**, v. 57, n. 2, p. 101–113, 2012.

INVERSO, J. A.; MEDINA-ACOSTA, E.; O’CONNOR, J.; RUSSELL, D. G.; CROSS, G. A. *Crithidia fasciculata* contains a transcribed leishmanial surface proteinase (gp63) gene homologue. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 57, n. 1, p. 47–54, 1993.

JESUS, R. C. S. DE; CORRÊA, Z. C.; EVERDOSA, D. R.; MARTINS, A. P.; ELISEU, L. S.; CAMPOS, M. B. Comparação das técnicas de RIFI (ag. IEC x ag. Bio-Manguinhos) e ELISA no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC), Estado do Pará, Brasil.

**Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 323, 2003.

JIMÉNEZ, M. I.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MOLINA, R.; CAÑAVATE, C.; ALVAR, J. HIV co-infection with a currently non-pathogenic flagellate. **Lancet**, v. 347, n. 8996, p. 264–5, 1996.

JOHN, S. W.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C. R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 2, p. 408, 1991.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–4, 2016.

LAHIRI, D. K.; NUMBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 19, p. 5444–5444, 1991.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 63, n. 2, p. 134–45, 1988.

LARANJEIRA, D. F.; MATTA, V. L. R. DA; TOMOKANE, T. Y.; MARCONDES, M.; CORBET, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Serological and infection statuses of dogs from a visceral leishmaniasis-endemic area. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 4, p. 563–571, 2014.

LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; MATTA, V. L. R. DA; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 296–300, 2013.

LAURENTI, M. D.; SANTANA LEANDRO, M. V. DE; TOMOKANE, T. Y.; LUCCA, H. R. L. DE; ASCHAR, M.; SOUZA, C. S. F.; SILVA, R. M.; MARCONDES, M.; MATTA, V. L. R. DA. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3–4, p. 444–450, 2014.

LEANDRO JR., M. V. S. **Análise comparativa do teste imunocromatográfico DPP-Biomanguinhos com ELISA e RIFI no diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2014.96f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2014.

LEÇA JÚNIOR, N. F.; GUEDES, P. E. B.; SANTANA, L. N.; ALMEIDA, V. DOS A.; CARVALHO, F. S.; ALBUQUERQUE, G. R.; WENCESLAU, A. A.; MUNHOZ, A. D.; SILVA, F. L. Epidemiology of canine leishmaniasis in southern Bahia, Brazil. **Acta Tropica**, v. 148, p. 115–119, 2015.

LÉGER, L. Sur un flagellé parasite de l'*Anopheles maculipennis*. **Compte Rendu des Seances de la Societe de Biologie**, v. liv, p. 354–356, 1902.

LEITE, R. S.; FERREIRA, S. D. A.; ITUASSU, L. T.; MELO, M. N. DE; ANDRADE, A. S. R. DE. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3–4, p. 201–206, 2010.

LEMOS, E. M.; LAURENTI, M. D.; MOREIRA, M. A. B.; REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; RAYCHAUDHURI, S.; DIETZE, R. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. **Acta tropica**, v. 107, n. 2, p. 205–7, 2008.

LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B.; MONCOL, D. J. Antibody activity to *Babesia canis* in dogs in North Carolina. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 3, p. 339–41, 1987.

LIMA, A. C. S.; ZAMPIERI, R. A.; TOMOKANE, T. Y.; LAURENTI, M. D.; SILVEIRA, F. T.; CORBETT, C. E. P.; FLOETER-WINTER, L. M.; GOMES, C. M. C. *Leishmania* sp. identification by PCR associated with sequencing of target SSU rDNA in paraffin-embedded skin samples stored for more than 30 years. **Parasitology Research**, v. 108, n. 6, p. 1525–1531, 2011.

LIMA, L.; ESPINOSA-ÁLVAREZ, O.; HAMILTON, P. B.; NEVES, L.; TAKATA, C. S. A.; CAMPANER, M.; ATTIAS, M.; SOUZA, W. DE; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 221, 2013.

LIMA, L.; ORTIZ, P. A.; SILVA, F. M. DA; ALVES, J. M. P.; SERRANO, M. G.; CORTEZ, A. P.; ALFIERI, S. C.; BUCK, G. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Repertoire, genealogy and genomic organization of cruzipain and homologous genes in *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*-like and other trypanosome species. **PloS One**, v. 7, n. 6, p. e38385, 2012.

LIMA, V. M. F. DE; FATTORI, K. R.; MICHELIN, A. DE F.; SILVEIRA NETO, L. DA; VASCONCELOS, R. DE O. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 3–4, p. 330–3, 2010.

LOMBARDO, G.; PENNISI, M. G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; CAPRÌ, A.; SOLANO-GALLEGO, L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 1, p. 10–17, 2012.

LONGSTAFFE, J. A.; GUY, M. W. Canine leishmaniasis—United Kingdom update. **Journal of Small Animal Practice**, v. 27, n. 10, p. 663–671, 1986.

LOPES, J. D.; CAULADA, Z.; BARBIERI, C. L.; CAMARGO, E. P. Cross-reactivity between *Trypanosoma cruzi* and insect trypanosomatids as a basis for the diagnosis of Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 6, p. 1183–8, 1981.

LÓPEZ-BREA, M. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis using indirect

immunofluorescence. **Revista Clinica Espanola**, v. 169, n. 4, p. 233–5, 1983.

LOSADA-BARRAGÁN, M.; CAVALCANTI, A.; UMÃ NA-PÉREZ, A.; PORROZZI, R.; CUERVO-ESCOBAR, S.; VALLEJO, A. F.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M.; CUERVO, P. Detection and quantification of *Leishmania infantum* in naturally and experimentally infected animal samples. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 57–64, 2016.

LUCIANO, R. M.; LUCHEIS, S. B.; TRONCARELLI, M. Z.; LUCIANO, D. M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.46, n. 3, p. 181-187, 2009.

LUVIZOTTO, M. C. R.; BIAZZONO, L.; EUGENIO, F. R.; ANDRADE, A. L. Leishmaniose visceral canina autóctone no município de Araçatuba, São Paulo. In: ANAIS DO 20º CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 1999, Águas de Lindóia, SP, **Anais...** Águas de Lindóia, SP, 1999. p. 24–25.

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. M. P.; PACHECO, R. S.; OLIVEIRA, F. S.; PEREIRA, S. A.; FIGUEIREDO, F. B.; BAPTISTA, C.; MARZOCHI, M. C. A. 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, n. 5, p. 442–5, 2006.

MALCHIODI, E. L.; CHIARAMONTE, M. G.; TARANTO, N. J.; ZWIRNER, N. W.; MARGNI, R. A. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). **Clinical and Experimental Immunology**, v. 97, n. 3, p. 417–23, 1994.

MARCIPAR, I. S.; ROODVELDT, C.; CORRADI, G.; CABEZA, M. L.; BRITO, M. E. F.; WINTER, L. M. F.; MARCIPAR, A. J.; SILBER, A. M. Use of full-length recombinant calflagin and its c fragment for improvement of diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5498–503, 2005.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5249–5255, 2004.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; FACUNDES, A.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. A questão do controle das Leishmanioses no Brasil. . In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R.(Ed.). **Leishmanioses do Continente Americano**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. p. 431–463.

MATOS, H. J. DE; PINTO, A. Y. DAS N.; MIRANDA, A. M. M.; SILVA, F. L. C.; RAMOS, F. L. DE P. Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 1, p. 65–68, 2015.



MCGHEE, R. B.; COSGROVE, W. B. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. **Microbiological reviews**, v. 44, n. 1, p. 140–173, 1980.

MCKERROW, J. H.; SUN, E.; ROSENTHAL, P. J.; BOUVIER, J. The Proteases and Pathogenicity of Parasitic Protozoa. **Annual Review of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 821–853, 1993.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515–9, 2005.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of Leishmania spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 255–9, 2002.

MOHAMMADIHA, A.; HAGHIGHI, A.; MOHEBALI, M.; MAHDIAN, R.; ABADI, A. R.; ZAREI, Z.; YEGANEH, F.; KAZEMI, B.; TAGHIPOUR, N.; AKHOUNDI, B.; BARATI, M.; MAHMOUDI, M. R. Canine visceral leishmaniasis: A comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of Leishmania infantum infection. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1–3, p. 83–90, 2013.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F. DA; COSTA, R. T. DA; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V. DE; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Visceral leishmaniasis: a study on phlebotomine sand flies and canine infection in Montes Claros, State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 147–52, 2005.

MONZON, C. M.; COLMAN, O. L. R. Seroepidemiologic diagnosis of south american equine trypanosomiasis (Mal de Caderas) by the indirect immunofluorescence test in the province of formosa (Argentina). 1983-1987. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 40, n. 4, p. 279–285, 1988.

MORAIS, A. N.; SOUSA, M. G.; MEIRELES, L. R.; KESPER, N.; UMEZAWA, E. S. Canine visceral leishmaniasis and Chagas disease among dogs in Araguaína, Tocantins. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 225–9, 2013.

MORAIS, R. C. S. DE; GONÇALVES, S. DA C.; COSTA, P. L.; SILVA, K. G. DA; SILVA, F. J. DA; SILVA, R. P. E.; BRITO, M. E. F. DE; BRANDÃO-FILHO, S. P.; DANTAS-TORRES, F.; PAIVA-CAVALCANTI, M. DE. Detection of Leishmania infantum in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Experimental & Applied Acarology**, v. 59, n. 4, p. 473–481, 2013.

MORIO, F.; REYNES, J.; DOLLET, M.; PRATLONG, F.; DEDET, J.-P.; RAVEL, C. Isolation of a protozoan parasite genetically related to the insect trypanosomatid Herpetomonas samuelpessoai from a human immunodeficiency virus-positive patient. **Journal of Clinical**

**Microbiology**, v. 46, n. 11, p. 3845–7, 2008.

MOURA, A. B. DE; SOUZA, A. P. DE; SARTOR, A. A.; BELLATO, V.; TEIXEIRA, E. B.; PISETTA, G. M. P.; JUNIOR, A. H. Ocorrência de anticorpos e fatores de risco para infecção por *Toxoplasma gondii* em cães, nas cidades de Lages e Balneário Camboriú, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 52–56, 2009.

MOUTTAKI, T.; MORALES-YUSTE, M.; MERINO-ESPINOSA, G.; CHIHEB, S.; FELLAH, H.; MARTIN-SANCHEZ, J.; RIYAD, M. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative *Leishmania* species in Morocco by using three PCR-based assays. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 420, 2014.

MUCCIO, T. DI; VERONESI, F.; ANTOGNONI, M. T.; ONOFRI, A.; FIORETTI, D. P.; GRAMICCIA, M. Diagnostic value of conjunctival swab sampling associated with nested PCR for different categories of dogs naturally exposed to *Leishmania infantum* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 2651–2659, 2012.

NICOLAS, L.; PRINA, E.; LANG, T.; MILON, G. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1666–9, 2002.

NORTH, M. J. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. **Microbiological Reviews**, v. 46, n. 3, p. 308–40, 1982.

NOYES, H. A.; REYBURN, H.; BAILEY, J. W.; SMITH, D. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2877–81, 1998.

ODUYE, O. O.; DIPEOLU, O. O. Blood parasites of dogs in Ibadan. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 17, n. 5, p. 331–7, 1976.

OLIVEIRA, T. M. F. DE S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D. DE; 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**, v. 17, n. 1, p. 7–11, 2008.

OLIVEIRA, T. M. F. DE S.; PEREIRA, V. F.; BENVENGA, G. U.; MARTIN, M. F. A.; BENASSI, J. C.; SILVA, D. T. DA; STARKE-BUZETTI, W. A. Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 2, p. 220–222, 2015.

PACHECO, R.; MARZOCHI, M.; PIRES, M. Parasite genotypically related to a monoxenous trypanosomatid of dog's flea causing opportunistic infection in an HIV positive patient. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 4, p. 531–537, 1998.

PAIVA CAVALCANTI, M. DE; FELINTO DE BRITO, M. E.; SOUZA, W. V. DE; MIRANDA GOMES, Y. DE; ABATH, F. G. C. The development of a real-time PCR assay for

the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **Veterinary Journal**, v. 182, n. 2, p. 356–358, 2009.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SANTOS, W. R. DOS; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T. DA; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 510–7, 2001.

PAULAN, S. DE C.; SILVA, H. R.; LIMA, E. A. C. DE F.; FLORES, E. F.; TACHIBANA, V. M.; KANDA, C. Z.; NORONHA JUNIOR, A. C. F. DE; DOBRE, P. R. Spatial distribution of canine Visceral Leishmaniasis in Ilha Solteira, São Paulo, Brazil. **Engenharia Agrícola**, v. 32, n. 4, p. 765–774, 2012.

PEREIRA, V. F.; CRISTINA BENASSI, J.; APARECIDA STARKE-BUZETTI, W.; TIAGO SILVA, D.; LAGE FERREIRA, H.; BORGES KEID, L.; MARTINS SOARES, R.; LETTICIE DE AZEVEDO RUIZ, V.; MARIA FERREIRA DE SOUSA OLIVEIRA, T. Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival swab PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 104–106, 2016.

PEREIRA, V. F.; STARKE-BUZZETI, W. A.; SILVA, D. T.; BENASSI, J. C.; MACHADO, R. Z.; OLIVEIRA, T. M. F. S. Uso de suabe conjuntival em inquéritos epidemiológicos para leishmaniose visceral canina. In: ANAIS DO XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2012, São Luís, MA, Brazil, **Anais...** São Luís, MA, Brazil: CBPV - COLÉGIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2012. p. 84. São Luís, MA, Brazil.

PILATTI, M. M.; FERREIRA, S. D. A.; MELO, M. N. DE; ANDRADE, A. S. R. DE. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 2, p. 255–257, 2009.

PODLIPAEV, S. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5, p. 648–652, 2001.

PODLIPAEV, S. A. Insect Trypanosomatids: the Need to Know More. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 517, n. 954, p. 517–517, 2000.

PORROZZI, R.; SANTOS DA COSTA, M. V.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; SANTOS, C. D. DOS; FERNANDES, A. P.; GAZZINELLI, R. T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, G. Comparative Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Based on Crude and Recombinant Leishmanial Antigens for Serodiagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania infantum* Visceral Infections in Dogs. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 544–548, 2007.

QUARESMA, P. F.; MURTA, S. M. F.; FERREIRA, E. DE C.; ROCHA-LIMA, A. C. V. M. DA; XAVIER, A. A. P.; GONTIJO, C. M. F. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, v. 111, n. 3, p. 289–94, 2009.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 7, p. 289–90, 2002.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2352–6, 2002.

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

ROLÃO, N.; CORTES, S.; RODRIGUES, O. R.; CAMPINO, L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction–enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 5, p. 1150–1154, 2004.

SANDERS, D. A. Observations on Canine Babesiosis (Piroplasmosis.). **American Veterinary Medical Association**, v. 90, n. 1, p. 27–38., 1937.

SANTA ROSA, A. C. I.; OLIVEIRA, S. C. I. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, v. 11, p. 24–28, 1997.

SANTOS, A. L. S.; ABREU, C. M.; ALVIANO, C. S.; SOARES, R. M. A. Use of proteolytic enzymes as an additional tool for trypanosomatid identification. **Parasitology**, v. 130, n. Pt 1, p. 79–88, 2005.

SANTOS, A. L. S.; BRANQUINHA, M. H.; D’AVILA-LEVY, C. M. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 4, p. 687–714, 2006.

SANTOS, A. L. S.; BRANQUINHA, M. H.; D’AVILA-LEVY, C. M. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 4, p. 687–714, 2006.

SARAIVA, L. **Estudo populacional de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Município de Belo Horizonte e no Parque Estadual do Sumidouro – Minas Gerais - Brasil**. 2015. 129f. Tese (Doutorado em Ciências). Centro de Pesquisas René Rachou/ FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, 2015.

SAVANI, E. S. M. M.; NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; CASTILHO, T. M.; ARAUJO, F. S. DE; ILHA, I. M. N.; CAMARGO, M. C. G. DE O.; D’AURIA, S. R. N.; FLOETER-WINTER, L. M. Occurrence of co-infection by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 739–41, 2005.

SCHULZ, A.; MELLENTHIN, K.; SCHONIAN, G.; FLEISCHER, B.; DROSTEN, C. Detection, Differentiation, and Quantitation of Pathogenic *Leishmania* Organisms by a

Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Real-Time PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1529–1535, 2003.

SEHGAL, S.; AIKAT, B. K.; PATHANIA, A. G. S. Immune complexes in Indian kala-azar. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 60, n. 6, p. 945–949, 1982.

SILVA, D. T. DA; STARKE-BUZETTI, W. A.; ALVES-MARTIN, M. F.; PAIXÃO, M. DOS S.; TENÓRIO, M. DA S.; LOPES, M. L. M. Comparative evaluation of several methods for canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 179–86, 2014.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.

SILVEIRA, J. F. DA; UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A. O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 6, p. 286–91, 2001.

SINGH, N.; CHIKARA, S.; SUNDAR, S. SOLiD™ sequencing of genomes of clinical isolates of *Leishmania donovani* from India confirm leptomonas co-infection and raise some key questions. **PloS One**, v. 8, n. 2, p. e55738, 2013.

SLAPPENDEL, R. J.; GREENE, C. E. Leishmaniasis. . In: GREENE, C. E.(Ed.). **Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: WB Saunders, 1990. p. 450–458.

SOLCÀ, M. DA S.; GUEDES, C. E. S.; NASCIMENTO, E. G.; OLIVEIRA, G. G. DE S.; SANTOS, W. L. C. DOS; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2–4, p. 133–140, 2012.

SOUZA, M. D. C.; REIS, A. P.; SILVA, W. D.; BRENER, Z. Mechanism of Acquired Immunity Induced by “*Leptomonas pessoai*” against *Trypanosoma cruzi* in Mice. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 579–584, 1974.

SOUZA, M. DE S.; MIZUTA, K.; IKEMOTO, H. In vitro exoantigen from *Herpetomonas samuelpessoai* which protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 22, n. 4, p. 184–91, 1980.

SOUZA, R. M.; BRAULLIO, I.; DELFINO DE OLIVEIRA, M.; CÂMARA DE SOUSA PAIVA, V.; LIMA, K. C.; PEREIRA, R.; SANTOS, D.; BRUNO DE ALMEIDA, J.; LUZ, G. Presence of antibodies against *Leishmania chagasi* in haemodialysed patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 749–751, 2009.

SPADA, J. C. P.; SILVA, D. T. DA; MARTINS, K. R. R.; RODAS, L. A. C.; ALVES,

M. L.; FARIA, G. A.; BUZUTTI, M. C.; SILVA, H. R.; STARKE-BUZETTI, W. A. Occurrence of *Lutzomyia longipalpis* (Phlebotominae) and canine visceral leishmaniasis in a rural area of. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2961, n. 4, p. 456–462, 2014.

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. 1729–1733, 2004.

SUNDAR, S.; MAURYA, R.; SINGH, R. K.; BHARTI, K.; CHAKRAVARTY, J.; PAREKH, A.; RAI, M.; KUMAR, K.; MURRAY, H. W. Rapid, noninvasive diagnosis of visceral leishmaniasis in India: comparison of two immunochromatographic strip tests for detection of anti-K39 antibody. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 251–3, 2006.

TAI, N. O. EL; FARI, M. EL; MAURICIO, I.; MILES, M. A; OSKAM, L.; SAFI, S. H. EL; PRESBER, W. H.; SCHÖNIAN, G. *Leishmania donovani*: Intraspecific Polymorphisms of Sudanese Isolates Revealed by PCR-based Analyses and DNA Sequencing. **Experimental Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 35–44, 2001.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 3, p. 512–26, 1993.

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**, v. 203, n. 1–2, p. 203–206, 2014.

TOLEZANO, J. E.; ULIANA, S. R. B.; TANIGUCHI, H. H.; ARAÚJO, M. F. L.; BARBOSA, J. A. R.; BARBOSA, J. E. R.; FLOETER-WINTER, L. M.; SHAW, J. J. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3–4, p. 280–284, 2007.

TURREL, J. M.; POOL, R. R. Bone lesions in four dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Radiology**, v. 23, n. 6, p. 243–249, 1982.

VERMELHO, A. B.; ALMEIDA, F. V. .; BRONZATO, L. S.; BRANQUINHA, M. H. Extracellular metalloproteinases in *Phytomonas serpens*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 221–224, 2003.

VEXENAT, A. DE 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 Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 3, p. 177–185, 1996.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 1317–1331, 1994.

VIOLA, L. B.; ATTIAS, M.; TAKATA, C. S. A.; CAMPANER, M.; SOUZA, W. DE; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogenetic Analyses Based on Small Subunit rRNA and Glycosomal Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Genes and Ultrastructural Characterization of Two Snake Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* fr. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 594–602, 2009.

VOLPINI, A. C.; PASSOS, V. M. A.; OLIVEIRA, G. C.; ROMANHA, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 90, n. 1, p. 31–7, 2004.

WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental Parasitology**, v. 18, n. 1, p. 124–193, 1966.

WELCH, R. J.; ANDERSON, B. L.; LITWIN, C. M. Rapid immunochromatographic strip test for detection of anti-K39 immunoglobulin G antibodies for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 9, p. 1483–4, 2008.

WHO, W. H. O. **First WHO report on neglected tropical diseases: Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Geneva 27, Switzerland, WHO Press, 2010.

WHO, W. H. O. **First WHO report on neglected tropical diseases: Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Geneva 27, Switzerland, WHO Press, 2014.

YANG, B. BIN; GUO, X. G.; HU, X. S.; ZHANG, J. G.; LIAO, L.; CHEN, D. L.; CHEN, J. P. Species discrimination and phylogenetic inference of 17 Chinese *Leishmania* isolates based on internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences. **Parasitology Research**, v. 107, n. 5, p. 1049–1065, 2010.