

Mariana Aschar Ferraz

Desempenho do swab oral no diagnóstico molecular de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora Prof.^a Dr.^a Márcia Dalastra Laurenti

São Paulo

2015

Mariana Aschar Ferraz

Desempenho do swab oral no diagnóstico molecular de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora Prof.^a Dr.^a Márcia Dalastra Laurenti

São Paulo
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferraz, Mariana Aschar

Desempenho do swab oral no diagnóstico molecular de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* / Mariana Aschar Ferraz. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Márcia Dalastra Laurenti.

Descritores: 1.Leishmaniose visceral 2.Cães 3.Leishmania infantum
4.Patologia molecular 5.Reação em cadeia da polimerase em tempo real
6.Sorologia.

USP/FM/DBD-491/15

*Dedico este trabalho ao meu grande companheiro,
Charles, e aos meus pais, Leonardo e Marilda,
pois sem eles este trabalho e muito dos
meus sonhos não se realizariam.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar os meus agradecimentos às duas grandes responsáveis pela realização desta dissertação, a Dra. Márcia Dalasta Laurenti, por ter aceitado ser a minha orientadora “no papel”, mas que no fim, me orientou em muitos detalhes fundamentais durante os meus experimentos e na composição de todo este trabalho, e principalmente, agradeço muito, a Dra. Vânia da Matta, que com todas as suas orientações e carinho, permitiu desde o começo a minha entrada no laboratório e me ajudou a conseguir realizar o sonho de defender um mestrado na Faculdade de Medicina.

Aos meus pais, Leonardo e Marilda, e ao meu marido, Charles, que sempre estiveram ao meu lado acreditando em mim e dando todo o suporte e apoio, mesmo naqueles momentos que eu estava insuportavelmente impossível, pois a conquista deste título foi vivida e trabalhada em cada detalhe o que me consumiu horas a fio com total dedicação e prazer. Ao meu irmão Marcelo, que torce por mim desde sempre e que está ao meu lado em todos os momentos. E não posso deixar de agradecer de coração aos meus sogros, Rubens e Cristina, e a minha cunhada, Suzana, que são a minha família e a minha base.

Porém sem a amizade e apoio de algumas pessoas eu não teria conseguido desempenhar desta forma este trabalho, portanto agradeço de coração a Thaise, a Fernanda Francesquini, a Ana Carolina e ao Fabio. Agradeço também as meninas da iniciação científica, Carina, Letícia e Carol, por terem me ajudado não só no trabalho, mas também pelas conversas.

Agradeço por todo o suporte e amizade de todos os alunos e funcionários do LIM50, à Lia por ter me ajudado em toda burocracia, ao Dr. Luiz Felipe por solucionar todas as minhas dúvidas que foram surgindo ao longo deste processo, ao Edson pelas brincadeiras, e a todas as meninas e meninos que passaram pelo laboratório, que de uma forma ou de outra ajudaram muito, Maria Fernanda, Ana Kelly, Brenda, Thais Bruna, Bruno, Jessica, Eduardo, Thays Fragoso, Fernanda Rodrigues e Joyce.

Agradeço aos funcionários do Programa de Fisiopatologia Experimental, que sempre se mostraram dedicados em me ajudar em toda a parte burocrática desde o começo até a entrega final desta dissertação.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida e ao Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP/LIM 50) por todo o suporte dado para a realização deste trabalho.

“Cada um terá que dar contas da inutilidade voluntária da sua existência,
o que é fatal para a felicidade futura.”

Allan Kardec

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com normas em vigor no momento.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com "*List of Journals Indexed in Index Medicus*".

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Distribuição geográfica.....	2
1.2. Agente etiológico e vetor.....	6
1.3. Ciclo Biológico.....	9
1.4. Leishmaniose visceral canina (LVC)	11
1.5. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina	12
1.6. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina	12
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVO.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1. Áreas de estudo.....	22
4.2. Critério de inclusão e origem dos animais	22
4.2.1. Exames físicos e laboratoriais	23
4.2.2. Grupos clínicos	23
4.3. Amostras clínicas.....	23
4.3.1. Coleta do material biológico.....	23
4.4. Diagnóstico Sorológico	24
4.4.1. Teste rápido (TR) DPP® Leishmaniose Visceral Canina - Bio- Manguinhos	24
4.4.2. Ensaio Imunoenzimático (EIE) Leishmaniose Visceral Canina - Bio- Manguinhos	26

4.5. PCR em tempo real (qPCR).....	28
4.5.1. Procedimentos de extração de DNA das amostras	28
4.5.2. Condições de ciclagem da PCR em tempo real (qPCR).....	31
4.5.3. Especificidade da qPCR com o uso dos <i>primers</i> LEISH 1 e LEISH 2	32
4.6. Análise Estatística.....	32
5. RESULTADOS	34
5.1. Especificidade da qPCR com os <i>primers</i> LEISH-1 e LEISH-2	34
5.2. Frequência de positividade da PCR em tempo real (qPCR) no swab oral e outras amostras clínicas	37
5.3. Diagnóstico Sorológico	39
5.4. Combinação entre os resultados da qPCR e com a sorologia.....	41
5.5. Carga parasitária nas amostras clínicas	46
5.6. Sinais clínicos e positividade da qPCR	48
5.7. Contribuição da qPCR em relação aos resultados negativos da sorologia	49
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO.....	63
8. REFERÊNCIAS.....	65
9. ANEXO I.....	78
10. ANEXO II.....	79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
kDNA	DNA do cinetoplasto
DPP	<i>Dual Path Platform</i>
TR-DPP	Teste rápido BioManguinhos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIE	Ensaio imunoenzimático
LN	Aspirado de linfonodo
LV	Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
PVCLVA	Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
SC	Swab conjuntival
SG	Sangue periférico
SO	Swab oral

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Distribuição mundial da leishmaniose visceral.----- 3
- Figura 2. Distribuição de municípios do Estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral Americana em dezembro de 2012. ----- 6
- Figura 3. Fêmea de *Lutzomyia longipalpis*. ----- 8
- Figura 4. A- Formas promastigotas de *Leishmania* sp. B- Formas amastigotas. Lâminas coradas por Giemsa, aumento 400X. ----- 9
- Figura 5. Ciclo de vida da *Leishmania*. ----- 10
- Figura 6. Kit teste rápido DPP® Leishmaniose Visceral Canina da Bio-Manguinhos, composto por uma placa branca (plataforma de duas vias-Dual Path Plataform) contendo a proteína recombinante de *Leishmania chagasi* e a proteína A conjugada ao ouro coloidal, adsorvidos em membranas de nitrocelulose, e um Tampão de Corrida.25
- Figura 7. A. Um resultado não reagente é indicado por uma linha rosa/roxa na área C (Controle) e nenhuma linha na área T (Teste), sugerindo a ausência de anticorpos para *Leishmania* na amostra. B. Um resultado reagente é indicado pela detecção de duas linhas rosa/roxa nas áreas C (Controle) e T (Teste), mostrando presença de anticorpos anti- *Leishmania* no soro investigado. A intensidade da linha na área de Teste (T) varia de claro a muito escuro conforme a concentração de anticorpos específicos. ----- 26
- Figura 8. Representação gráfica das temperaturas de dissociação (T_m) obtidas com DNA de oito espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) em duplicata, com o uso dos *primers* LEISH-1 e LEISH-2. ----- 35
- Figura 9. Porcentagem de resultados positivos no swab oral (SO), swab conjuntival (SC), sangue (SG) e aspirado de linfonodo (LN) na qPCR. ----- 37
- Figura 10. Porcentagem dos resultados positivos e negativos obtida no teste rápido e imunoenzimático com os soros dos 92 cães. ----- 40

Figura 11. Resultados positivos em cada teste sorológico em relação aos grupos sintomático (GS) e assintomático (GA) comparados ao resultado total.-----	41
Figura 12. Porcentagem de positividade encontrada em 92 cães pela combinação dos resultados do swab oral com outras amostras e a sorologia. -----	42
Figura 13. Porcentagem de positividade encontrada nos 30 cães assintomáticos pela combinação dos resultados do swab oral com outras amostras e a sorologia. -----	43
Figura 14. Porcentagem de positividade encontrada nos 62 cães sintomáticos pela combinação dos resultados do swab oral com outras amostras e a sorologia. -----	44
Figura 15. Carga parasitária absoluta nas diferentes amostras clínicas (log10). -----	46
Figura 16. Carga parasitária absoluta (log10) nas diferentes grupos clínicos. -----	47
Figura 17. Organograma para a escolha do melhor tecido para utilização da técnica molecular baseada na sorologia e grupos clínicos dos cães. -----	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cálculo para obtenção do resultado final do EIE LVC Bio-Manguinhos. ----	27
Tabela 2. Valores médios das temperaturas de melting (Tm) e desvios- padrão (DP) de oito espécies de <i>Leishmania</i> e <i>T. cruzi</i> obtidos na qPCR com os <i>primers</i> LEISH-1 e LEISH-2.-----	36
Tabela 3. Porcentagem de resultados positivos nas diferentes amostras obtidos na qPCR no grupo assintomático (GA) e sintomático (GS). -----	38
Tabela 4. Concordância dos resultados do swab oral com as outras amostras e a sorologia. -----	39
Tabela 5. Distribuição dos resultados obtidos por qPCR e DPP® + EIE nos 92 cães de área endêmica infectados por <i>Leishmania (L.) infantum</i> .-----	45
Tabela 6. Correlação da carga parasitária entre as amostras estudadas. -----	48
Tabela 7. Comparação entre os sinais clínicos agrupados de acordo com o número de manifestações com os diagnósticos sorológico e molecular.-----	49

RESUMO

Ferraz MA. Desempenho do swab oral no diagnóstico molecular de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

O cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório de *Leishmania (Leishmania) infantum*. Sua alta competência em transmitir o parasito para o inseto vetor contribui para a manutenção do ciclo e aumento do risco para os humanos em áreas endêmicas. O amplo espectro de manifestações clínicas da leishmaniose visceral canina (LVC) torna seu diagnóstico bastante complexo, já que essas manifestações podem se sobrepor àquelas causadas por outros agentes infecciosos. Fator agravante é que a infecção, na maior parte das vezes, tem caráter subclínico, podendo passar despercebida. Diante disto, um diagnóstico confiável se faz necessário para confirmar uma suspeita clínica ou infecção inaparente. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem contribuído em muito para o aumento da sensibilidade do diagnóstico, e seu uso mostra que a prevalência da infecção canina por *L. (L.) infantum* em áreas endêmicas pode ser bem maior do que a apontada pela sorologia. É sabido que um dos fatores limitantes do emprego de uma técnica diagnóstica em larga escala refere-se à coleta do material clínico que, idealmente, deve ser simples, rápida e indolor. Assim, entende-se que a associação da PCR com amostras não invasivas, de fácil coleta, poderia representar uma contribuição importante para o diagnóstico da LVC. Dessa forma, a proposta do presente projeto foi investigar o valor do

swab oral (SO) na detecção de *L. (L.) infantum* em cães oriundos de áreas onde ocorre transmissão do parasito, através do uso da PCR em tempo real, considerada a mais sensível dentre as técnicas moleculares. Para tanto, comparamos sua positividade com a encontrada em outra amostra não invasiva (swab conjuntival= SC), pouco invasiva (sangue periférico= SG) e invasiva (aspirado de linfonodo=LN) e com a sorologia, considerando grupos clínicos, carga parasitária, índice de concordância entre os resultados, e a combinação dos resultados das diferentes amostras e a sorologia com aqueles obtidos no SO. Noventa e dois cães com comprovada infecção participaram do estudo. Os animais foram classificados em sintomáticos (n=63) e assintomáticos (n=29), de acordo com o exame físico e provas laboratoriais. No presente estudo a positividade do SO (67,4%) foi equivalente a do SC (68,5 %), maior do que a encontrada no SG (52,2%), e menor quando comparada ao LN (84,8%). Considerando os grupos clínicos, o SO foi positivo em 81 % dos cães sintomáticos e em 37,9 % dos assintomáticos. A positividade encontrada no SC também foi maior no grupo sintomático em relação ao assintomático (82,5 % x 37,9 %), assim como no LN (93,7 % x 65,5 %), mas não no SG (62,1 % x 47,6 %) e na sorologia (77,8 % x 79,3 %). Salienta-se que o SO foi positivo em 35 % dos cães com sorologia negativa (n=20), o SC em 35%, o SG em 40 %, o LN em 70 %, e OS+CS em 60% deles. A concordância dos resultados do SO foi moderada em relação à conjuntiva ($k= 0,3$) e fraca em relação às demais amostras e a sorologia ($0.2 < k < 0.3$). A carga parasitária do SO, por sua vez, não se diferiu da conjuntival, ambas foram maiores do que a encontrada no SG, e o LN apresentou a maior carga, mostrando uma clara correlação da intensidade do parasitismo com os índices de positividade obtidos. O LN

mostrou o maior parasitismo entre as amostras analisadas. A combinação dos resultados do SO e SC atingiram 84 % de positividade nos 92 cães estudados, 92,1 % no grupo sintomático e 65,5 % no assintomático. Em suma, o presente estudo mostrou a presença do DNA de *L. (L.) infantum* no swab oral de cães infectados através da PCR em tempo real, revelando seu potencial uso no diagnóstico da LVC em cães com suspeita clínica dada a sua alta positividade nos animais com sintomatologia, equivalente à encontrada na amostra invasiva, o aspirado de linfonodo. Em oposição, encontrou-se baixa positividade nos cães assintomáticos, mas seu uso combinado com outra amostra não invasiva, a conjuntiva, atingiu patamares satisfatórios. O fato do SO ter sido positivo em parte dos animais soronegativos aponta vantagem adicional do seu uso na investigação de infecção por *L. (L.) infantum* em inquéritos epidemiológicos ou mesmo na rotina clínica. Por fim, os nossos resultados mostraram que a combinação de testes e amostras é necessária para a identificação de cães infectados por *L. (L.) infantum*, e que a PCR com o swab oral, especialmente associado ao swab conjuntival, pode contribuir de forma significativa para o diagnóstico da infecção canina, seja ela sintomática ou assintomática.

Descritores: Leishmaniose visceral; cães; *Leishmania infantum*; patologia molecular; reação em cadeia da polimerase em tempo real; sorologia.

ABSTRACT

Ferraz MA. Performance of the oral swab in the molecular diagnosis of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) infantum* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Dog (*Canis familiaris*) is the major reservoir of *Leishmania (L.) infantum*. Its high competence for transmitting the parasite to the vector contributes to the maintenance of the cycle and for increasing risk to humans in endemic areas. The wide spectrum of clinical manifestations of canine visceral leishmaniasis (CVL) makes the diagnosis quite complex, since the symptoms can overlap those caused by other infectious agents. Of note, the infection is mostly subclinical, making the diagnosis even more difficult. Therefore, an accurate diagnosis is necessary to confirm a clinical suspicion or the silent infection. The polymerase chain reaction (PCR) has greatly contributed for increasing the diagnostic sensitivity, and its use shows that *L. (L.) infantum* canine infection in endemic areas may be much higher than that pointed by serology. It is known that one limiting factor of using a diagnostic method in large scale refers to the collection of clinical samples which should be ideally simple, quick, and painless. Thus, it is understood that the association of PCR with non-invasive samples could represent an important contribution to the diagnosis of CVL. Therefore, the purpose of this study was to investigate the value of the oral swab (OS) in detecting *L. (L.) infantum* in dogs from areas of parasite

transmission through the use of real-time PCR that is considered the most sensitive among the molecular techniques. To this end, we compared the OS positivity with that found in other non-invasive (conjunctival swab = CS), minimally invasive (blood = BL) and invasive (lymph node aspirate = LN) samples and serology, considering clinical groups, parasite load, agreement among results, and the combination of results from different samples and serology with those obtained with OS. Ninety-two dogs with proven infection were selected for this present study. The animals were divided into symptomatic (n = 63) and asymptomatic (n = 29) dogs, according to the physical examination and laboratory tests. Here, the positivity in OS (67.4%) was equivalent to the CS (68.5%), higher than that found in BL (52.2%), and lower when compared to LN (84.8%). Regarding clinical groups, OS was positive in 81% of the symptomatic dogs and in 37.9% of asymptomatic ones. The positivity in CS was also higher in the symptomatic compared to the asymptomatic group (82.5% x 37.9%) and in LN (93.7% x 65.5%), but not in BL (62.1% x 47.6%) and serology (77.8% x 79.3%). Noteworthy, the OS was positive in 35% of dogs with negative serology (n = 20), CS in 35%, BL in 40% and LN in 70%. Moderate agreement was found between OS results and CS results ($k = 0.3$) and weak in comparison to other samples and serology ($0.2 < k < 0.3$). The parasite load was equivalent between OS and CS, both were higher than that found in BL, and LN presented the highest burden, showing that parasitism intensity and the positivity rates are correlated. The combination of OS and CS results reached 84% positivity in 92 dogs studied, 92.1% for symptomatic dogs and 65.5% for asymptomatic ones. In summary, the present study showed the presence of *L. (L.) infantum* DNA in oral swab of infected dogs by real-time PCR, revealing its

potential use for diagnosing CVL in animals with clinical suspicion due to its high positivity in dogs with symptoms, equivalent to that found in invasive sample, the lymph node aspirate. In contrast, low positivity was found in asymptomatic dogs, but the combined use with other non-invasive sample, the conjunctiva, reached satisfactory levels. OS positivity found in part of the seronegative animals points additional advantage of using OS in the investigation of *L. (L.) infantum* infection in epidemiological surveys or in clinical practice. Finally, our findings pointed that combination of tests and samples is required for identifying dogs infected with *L. (L.) infantum*, and that the PCR with oral swab, especially associated with the conjunctival swab, can contribute for diagnosing both asymptomatic and symptomatic dogs.

Descriptors: Leishmaniasis, visceral; dogs; *Leishmania infantum*; pathology, molecular; real-time polymerase chain reaction; serology.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose engloba um grupo de doenças infecciosas que são causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. A transmissão do parasito ao homem e a outros mamíferos se dá através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. De acordo com a espécie de *Leishmania* e a resposta imune do hospedeiro vertebrado, a doença pode se manifestar em diferentes formas clínicas, tais como: leishmaniose visceral, cutânea localizada, mucocutânea, cutânea disseminada e cutânea difusa. Dentre estas, a forma mais comum é a cutânea localizada caracterizada pela formação de úlceras na pele. Já a forma mucocutânea afeta as mucosas nasal e oral, causando destruição do septo nasal e deformidade na face. As formas cutâneas difusa e disseminada são as que apresentam menor número de casos, porém sua gravidade está ligada ao fato de serem refratárias aos esquemas terapêuticos convencionais, exigindo sempre uma maior atenção do clínico. A forma visceral, por sua vez, é considerada a mais grave, pois acomete o organismo de forma sistêmica e pode ser fatal quando não tratada. (WHO, 2014; Desjeux, 2004).

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença de caráter endêmico e sua expansão geográfica se relaciona à urbanização ocorrida de forma desordenada, migração humana constante, desmatamento acelerado e, principalmente, à adaptação do vetor a novos ecótopos e a presença do cão (*Canis familiaris*) no ambiente doméstico (Alves; Bevilacqua, 2004; Lainson; Rangel, 2005; Alvar et al., 2012; Faria; Andrade, 2012).

A LV é considerada uma das seis principais endemias do mundo, acometendo cerca de 400 mil indivíduos a cada ano (WHO, 2014). Falhas nas medidas de prevenção e controle e a co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) têm impulsionado o aumento da incidência da LV no mundo (Boelaert, 2000; Desjeux, 2004; Chappuis et al., 2007).

A LV está presente em pelo menos 65 países e é responsável pela segunda maior causa de óbitos no que se refere a doenças parasitárias, ficando atrás apenas das mortes por malária. Estima-se que cause aproximadamente 59.000 mortes por ano, no entanto, este valor é subestimado, pois a notificação da doença não é obrigatória em todo o mundo. Além disso, muitas vezes a doença não é diagnosticada, principalmente em locais com difícil acesso aos serviços de saúde e tratamento (Desjeux, 2004, Dantas-Torres, 2006; Dantas-Torres; Brandão-Filho, 2006).

A LV tem sido considerada uma das mais complexas doenças tropicais devido à sua ampla diversidade clínica e epidemiológica (Chappuis et al., 2007). Sob o ponto de vista epidemiológico, pode ser classificada como uma zoonose, incluindo animais hospedeiros como reservatórios no ciclo de transmissão, ou antropozoonose, quando o homem também se apresenta como fonte de infecção para o inseto vetor (Desjeux, 2004).

1.1. Distribuição geográfica

Mais de 90% dos casos de LV ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (Figura 1) (WHO, 2014). No país, a LV é uma doença endêmica encontrada nas cinco regiões brasileiras e em 21

estados da federação (BRASIL, 2010). Salienta-se que a doença tem adquirido um caráter urbano e tanto o número de casos quanto as áreas geográficas afetadas têm crescido nas duas últimas décadas (Dantas-Torres, 2006; Dantas-Torres; Brandão-Filho, 2006; Costa, 2008). Entre 1980 e 2005, o Brasil registrou quase 60 mil casos humanos e, na última década, a média anual de casos de LV foi 3.379 e a incidência de 1,9 casos por 100.000 habitantes (Maia-Elkhoury et al., 2008; BRASIL, 2010).



Figura 1. Distribuição mundial da leishmaniose visceral.

Fonte: OMS, 2013.

Estudos realizados na Europa verificaram que o aumento do número de indivíduos imunossuprimidos devido à infecção pelo HIV, transplantes ou ainda pelo uso de agentes quimioterapêuticos resultou no aumento da leishmaniose (Ready, 2010). A ocorrência da LV em pacientes com HIV vem se intensificando, e pode levar a formas mais graves que são difíceis de tratar. Até 2010, a coinfeção foi notificada em 35 países, embora se acredite que o número de casos dessa coinfeção seja subnotificado, principalmente pelo fato

da LV acometer populações desatendidas e, também, por não fazer parte da lista das doenças oportunistas associadas ao HIV (Montoalvo et al, 2012; WHO, 2014). Outro fator associado ao aumento de casos refere-se a viagens internacionais, pois estas tem determinado uma maior ocorrência de leishmaniose em países onde a doença não é endêmica (Field et al., 2008).

No Brasil, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, a incidência da doença vem aumentando em consequência dos problemas ambientais, das condições de vida desfavoráveis da população e aumento do fluxo migratório com ocupações desordenadas nas áreas urbanas (Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006; Werneck, 2010). Na década de 1990, somente 10% dos casos notificados ocorriam fora da Região Nordeste, no entanto, a partir de 2007, esse número alcançou 50% dos casos. Entre 2006 a 2008, a transmissão autóctone da LV foi registrada em mais de 1.200 municípios no país (Werneck, 2010).

Antigamente a doença era comum nas áreas rurais, mas a partir da década de 80 a o número de casos de LV vem aumentando nas áreas urbanas, principalmente devido à presença do cão, que exerce papel fundamental na manutenção do ciclo e é o principal reservatório doméstico de *Leishmania (L.) infantum chagasi* (Werneck, 2010).

Nas áreas endêmicas, apesar da doença poder acometer pessoas de todas as idades, 80% das pessoas infectadas são crianças, principalmente quando se trata de novos focos de transmissão. A maior parte das pessoas infectadas permanece assintomática ou apresenta uma forma leve da doença. Ao realizar o acompanhamento desses indivíduos, nota-se que alguns se mantêm assintomáticos, evoluindo para cura, enquanto outros desenvolvem

uma forma grave, associada à malnutrição, infecções concomitantes e características genéticas, sendo os dois primeiros fatores de grande importância para o Brasil (BRASIL, 2010).

Em relação ao Estado de São Paulo, o primeiro caso humano ocorreu em 1999 no município de Araçatuba, um ano depois do primeiro caso de LV canina (LVC) ter sido notificado (Camargo-Neves; Katz, 1999; Galimberti et al. 1999). Em Andradina, região administrativa de Araçatuba, ocorreu fato semelhante, pois em 1999 surgiram os primeiros casos de LVC, um ano após ter sido detectada a presença do vetor flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. A doença humana, no entanto, foi registrada apenas dois anos depois, em 2001 (Camargo-Neves, 2004). A partir desta data, a doença vem apresentando um franco processo de expansão no Estado rumo a capital, através da rodovia Marechal Rondon. Bem próxima à capital, a cidade de Embu Artes, que faz parte dos municípios pertencentes a Grande São Paulo, teve confirmada a presença de LVC pela primeira vez em 2003, porém a doença humana não foi registrada até o momento (BEPA, 2011). Ressalta-se que o vetor natural não foi encontrado nessa localidade, mas apenas as espécies *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri*. (Shimabukuro; Galati, 2011), vetores da leishmaniose cutânea no Brasil (Rangel; Lainson, 2009; Pita-Pereira et al., 2011).

Segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana (PVCLVA) no Estado de São Paulo, a LVA já ocorria em 105 municípios até o final de 2012, 70 deles com casos autóctones humanos e caninos, cinco somente com casos humanos, e 30 apenas com transmissão canina (Rangel et al., 2013) (Figura 2). O vetor *Lutzomyia longipalpis* foi

encontrado em 148 municípios, destes 100 apresentaram a transmissão canina ou humana e 48 não apresentaram nenhuma forma de transmissão da doença. Já em seis municípios com transmissão autóctone não foi detectada a presença do vetor (Rangel et al, 2013).

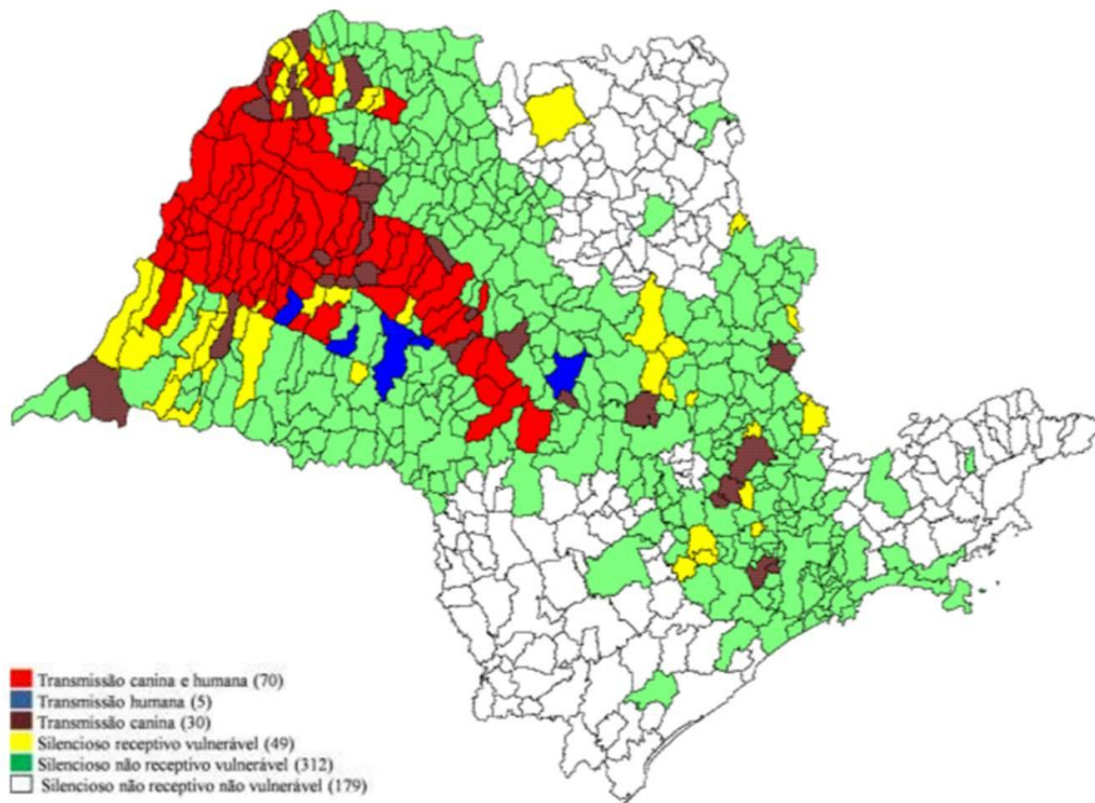


Figura 2. Distribuição de municípios do Estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral Americana em dezembro de 2012.

Fonte: Rangel 2013.

1.2. Agente etiológico e vetor

O gênero *Leishmania*, que consiste em protozoários tripanossomatídeos pertencentes à ordem Kinetoplastida, abrange mais de 20 espécies diferentes.

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros com base nas diferenças

anatômicas dos locais de desenvolvimento do parasito no intestino do vetor: subgênero ***Leishmania***, encontrado em países da América (Novo Mundo) e na Europa, Ásia e África (Velho Mundo), e o subgênero ***Viannia***, encontrado apenas no Novo Mundo (Lainson & Shaw 1978; Fiocruz, 1997).

A análise de isoenzimas (Multilocus Enzyme Electrophoresis - MLEE) (Cupolillo et al., 2003) é procedimento mais utilizado para a caracterização e identificação de espécies de *Leishmania*. Recentemente, as técnicas moleculares que foram introduzidas para o diagnóstico laboratorial da doença também se tornaram úteis na identificação das espécies (Foulet et al., 2007; Pace, 2014).

A LV é causada por três espécies: *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*. *L. (L.) donovani* causa somente infecção em humanos, enquanto *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* causam LV em humanos e em cães, entre outros animais silvestres e domésticos (REY, 2008).

As espécies *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* são os agentes causadores da LV nas áreas do mar Mediterrâneo e do Oriente Médio (Fraser, 2008). Já a espécie *L. (L.) chagasi* é responsável pela LV nas Américas Central e do Sul, incluindo o Brasil (Ferreira et al., 2003; Almeida et al., 2005). De acordo com alguns pesquisadores e com estudos genômicos, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* vem sendo consideradas como a mesma espécie (Segatto et al., 2012). Neste estudo, assumimos a nomenclatura *L. (L.) infantum* para o agente causador da LV no Brasil.

No Brasil, a LV é transmitida através da picada da fêmea de insetos flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* (Figura 3) e *Lu. cruzi* infectados. Uma vez infectado, o reservatório apresentará parasitismo de pele e no sangue

periférico permitindo a transmissão do parasito a outro vetor durante seu repasto sanguíneo e deste para o homem (BRASIL, 2010).



Figura 3. Fêmea de *Lutzomyia longipalpis*.
Fonte: Ray Wilson, *Liverpool School of Tropical Medicine*.

Esses parasitos apresentam duas fases no ciclo biológico: uma extracelular que ocorre no hospedeiro invertebrado (flebótomo) assumindo a forma morfológica flagelada, promastigota e, uma fase intracelular no hospedeiro vertebrado com a forma morfológica ovoide, aflagelar, denominada amastigota (Fiocruz, 1997).

A forma flagelada ou promastigota (Figura 4A) observada no hospedeiro invertebrado é alongada, com cinetoplasto (extensão da mitocôndria), localizado na base da bolsa flagelar e núcleo central. As formas amastigotas (Figura 4B) são encontradas no interior de células do sistema fagocitário mononuclear (macrófagos e monócitos) dos hospedeiros vertebrados, principalmente em órgãos como baço, fígado, gânglios linfáticos e medula óssea. Apresentam a forma ovóide, por vezes elíptica ou fusiforme, com núcleo grande, arredondado e excêntrico, sem flagelos e cinetoplasto junto ao núcleo (REY, 2008).

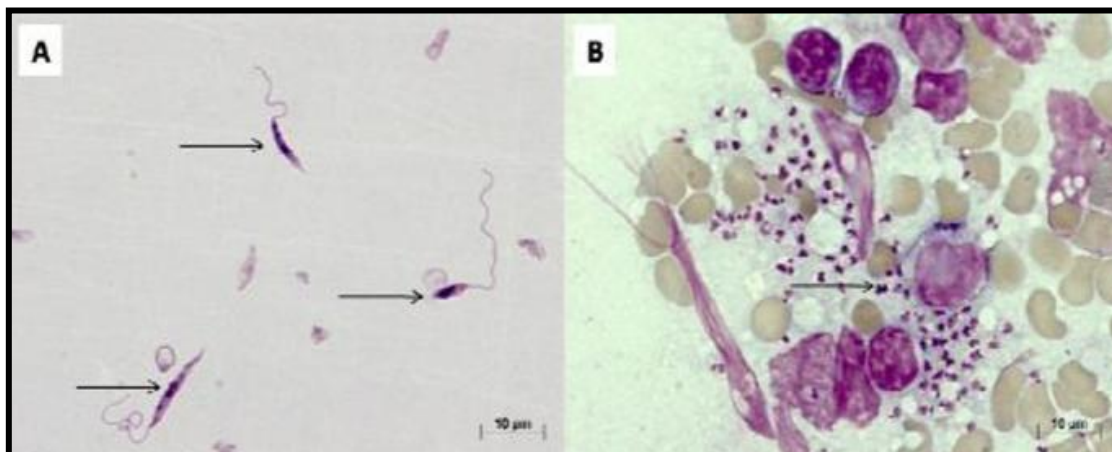


Figura 4. A- Formas promastigotas de *Leishmania* sp. B- Formas amastigotas. Lâminas coradas por Giemsa, aumento 400X.

Fonte: A- Bruno Luiz Soares Campos, B- Thaise Yumie Tomokane.

1.3. Ciclo Biológico

Durante o ciclo biológico dos parasitos do gênero *Leishmania*, as fêmeas da espécie *Lu. longipalpis*, que são responsáveis pela transmissão da *L. (L.) infantum*, ao realizarem o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado ingerem macrófagos infectados com as formas amastigotas do protozoário que irão migrar para o interior do trato digestório do vetor. Dentro do trato digestório anterior dos flebotomíneos, ocorre o rompimento dos macrófagos liberando as amastigotas que posteriormente se diferenciam em promastigotas, multiplicando-se por divisão binária. Estas por sua vez, colonizam o esôfago e a faringe do vetor, aderem ao epitélio pelo flagelo, se diferenciando em formas infectantes - promastigotas metacíclicas. As formas infectantes são regurgitadas durante um novo repasto sanguíneo em um novo hospedeiro vertebrado. Neste, as formas infectantes depositadas na derme migram para os órgãos linfóides secundários, ocorrendo então o processo de visceração,

principalmente no fígado, baço, medula óssea e linfonodos, infectando células do sistema fagocítico mononuclear como monócitos e macrófagos onde se transformam em amastigotas, se multiplicam, levando à lise macrófagos que liberam as formas amastigotas que se dispersam pelas vias hematogênica e linfática, infectando novos macrófagos (BRASIL, 2006; REY, 2008) (Figura 5).

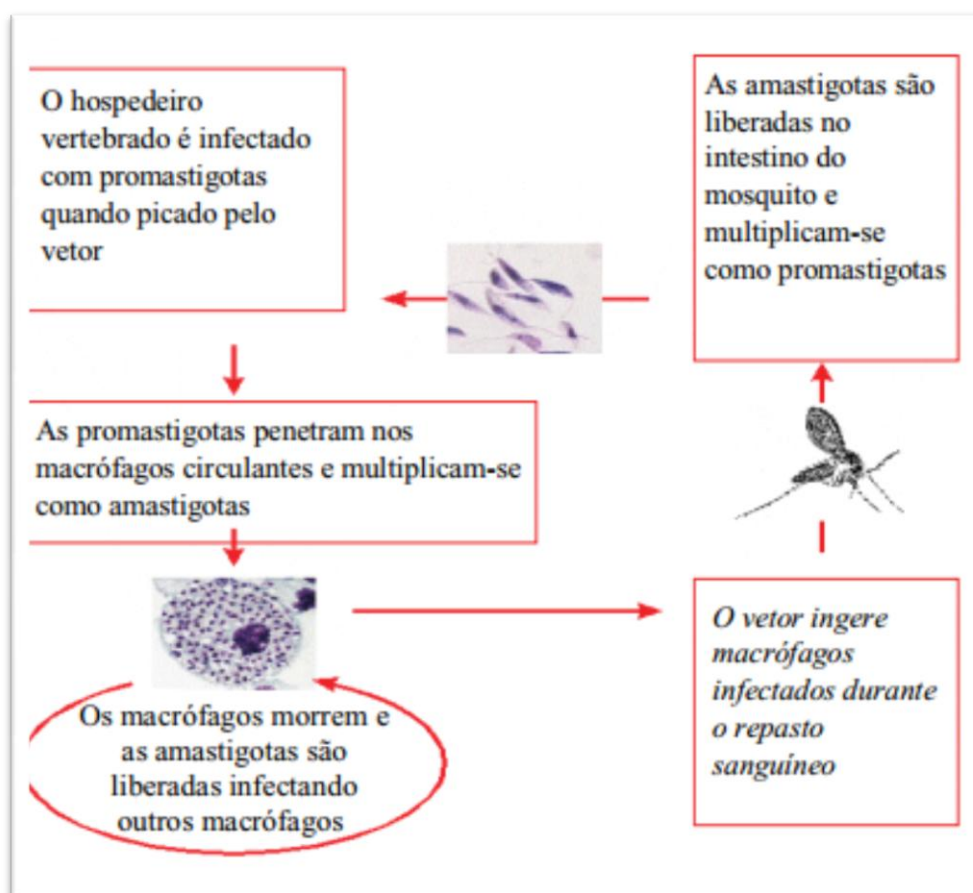


Figura 5. Ciclo de vida da *Leishmania*.

Fonte: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde. 1ª Ed. 2014:17p.

1.4. Leishmaniose visceral canina (LVC)

O cão doméstico (*Canis familiaris*) possui papel fundamental na manutenção da LV por atuar como o principal reservatório do parasito. Do ponto de vista epidemiológico, a LVC deve também ser considerada de grande importância, uma vez que a doença canina geralmente precede a ocorrência de casos humanos e também porque os cães infectados são fonte competente de transmissão do parasito para o inseto vetor, aumentando o risco para os humanos (Paranhos-Silva et al., 1996; Michalsky et al., 2007; Fraga et al., 2012; Laurenti et al., 2013).

Sua grande suscetibilidade à infecção e o intenso parasitismo da pele contribuem para que o cão seja a principal fonte de infecção do inseto vetor (Giunchetti et al., 2006; Coura-Vital et al., 2014).

Para controlar a propagação da doença, o Ministério da Saúde, através do PVCLVA, instituiu várias medidas, incluindo o diagnóstico precoce e o tratamento de todos os casos humanos, a eutanásia de cães soropositivos, e o controle de insetos vetores (Ministério da Saúde, 2006). A eutanásia de cães soropositivos é controversa e alguns relatos sugerem que tem pouco impacto sobre a redução de casos humanos e caninos (Courtenay et al., 2002; Grimaldi et al., 2012a). Essa falha é atribuída a atrasos na detecção e eliminação dos cães infectados e pela facilidade e tendência na substituição dos cães soropositivos eutanasiados por outros cães, na maior parte das vezes recém nascidos e mais suscetíveis à infecção por *L. (L.) infantum* (Nunes et al., 2008; Silva et al., 2011).

1.5. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina

Uma vez infectados, os cães podem não manifestar a doença (assintomáticos) ou a manifestam de forma branda (oligossintomáticos). Outros, no entanto, podem apresentar um amplo espectro de sinais e sintomas clínicos na vigência da infecção (sintomáticos) como perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, epistaxe, alterações oculares e inúmeras manifestações dermatológicas como alopecia, dermatite, lesões cutâneas nodulares ou ulceradas, seborreia, descamação e onicogrifose (Alvar et al., 2004). Esse amplo espectro clínico pode se sobrepor ao de outras doenças como a erliquiose, babesiose, demodicose, dermatites infecciosas, neoplasias cutâneas, entre outras (Gomes et al 2008), o que torna o diagnóstico clínico da LVC bastante difícil. Sendo assim, o diagnóstico laboratorial, quer seja direto (parasitológico) ou indireto (sorológico), é de suma importância para a confirmação da infecção por *L. (L.) infantum*.

1.6. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina

O diagnóstico laboratorial é realizado por duas razões principais: (1) para confirmar a doença em cães com sinais e/ou anormalidades clinicopatológicas compatíveis com LVC e (2) para investigar possível infecção em animais aparentemente saudáveis que vivem em regiões endêmicas (Miró et al., 2008). As reações sorológicas são de longe as mais usadas para tal fim, especialmente nos inquéritos censitários ou amostrais praticados em regiões endêmicas. Entretanto, não discrimina adequadamente a população canina

infectada (Laranjeira et al., 2014) e cães vacinados dos verdadeiramente infectados (Marcondes et al., 2013), além de apresentar inúmeras reações cruzadas com o soro de cães com outras patologias (Rosário et al., 2005; Zanette et al., 2014; Laurenti et al., 2014). Os animais assintomáticos são ainda mais difíceis de serem diagnosticados, já que aparentemente saudáveis e com produção de anticorpos em níveis muitas vezes indetectáveis, sendo um desafio até hoje diagnosticar tais casos (Porrozzi et al., 2007).

Pelo desempenho inadequado da sorologia, surge uma reação forte e veemente por parte da população e médicos veterinários, uma vez que no Brasil o cão é destinado à eutanásia como medida de controle da LV e unicamente pelo critério da soropositividade (BRASIL, 2014). Nessa direção, estudo revela que a baixa acurácia dos testes sorológicos faz com que um número muito alto de animais falso-positivos sejam eutanasiados desnecessariamente e animais com resultados falso-negativos não o sejam, potencializando risco aos humanos (Alves; Bevilacqua, 2004).

Até o final de 2011, o PVCLVA preconizava o uso do ensaio imunoenzimático (EIE) como teste de triagem e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) como método confirmatório, ambos produzidos por BioManguinhos com antígeno de *L. major*-like. Entretanto, a fim de melhorar a acurácia do diagnóstico sorológico, foi introduzido o teste rápido DPP[®] Leishmaniose Visceral Canina que utiliza uma proteína de fusão contendo os recombinantes K26 e K39 como antígeno. Embora o teste DPP[®] tenha melhorado a acurácia do diagnóstico, seu desempenho como teste de triagem ainda não é ideal (Grimaldi et al., 2012b; Laurenti et al., 2014). A grande vantagem do teste é a sua praticidade, não necessitando de laboratório

equipado ou profissional especializado para sua execução, contribuindo com os programas de controle para a leishmaniose (Reithinger et al., 2002b; Mohebbali et al., 2004).

O diagnóstico parasitológico, por sua vez, poderia minimizar ou mesmo resolver vários pontos negativos acima ressaltados sobre o desempenho dos testes sorológicos. Tal diagnóstico se faz pelo encontro de formas amastigotas de *Leishmania* em esfregaços de punções aspirativas de linfonodo ou medula óssea corados com Giemsa (exame direto), em biópsias de tecidos coradas com hematoxilina/eosina ou, menos frequentemente, por imunomarcacão tecidual ou cultivo do material em meios especiais (Grimaldi; Tesh, 1993; Xavier et al., 2006; Moreira et al., 2007). Saliencia-se que todos estes métodos são realizados em amostras invasivas, demandando eventual sedacão do animal, consumo de tempo na coleta como também no processamento e análise do material à microscopia, tornando impraticável sua realizacão em larga escala.

Dentre as possibilidades atuais, o diagnóstico molecular é o que contempla de forma mais ampla as características desejadas de um bom teste. Tal diagnóstico visa à deteccão de DNA de *Leishmania* na amostra clínica através da reacão em cadeia da polimerase (PCR), cujo princípio se baseia na amplificacão *in vitro* de sequencias de nucleotídeos exclusivas do parasito. O produto amplificado pode ser revelado por eletroforese em gel de agarose (PCR caseira) ou pela deteccão de fluorescência emitida durante o processo de amplificacão (PCR em tempo real, também denominada qPCR) (Ramos et al., 2012; Reis et al., 2013; Pereira et al., 2014). É importante ressaltar que a presenca de DNA de *Leishmania* na amostra clínica guarda correlacão com a

viabilidade do parasito. Em um experimento *in vitro*, Prina et al. (2007) mostraram que a morte de amastigotas induzida por molécula leishmanicida foi acompanhada pela drástica redução da carga parasitária quantificada pela qPCR, carga essa estimada após 1 hora do tratamento das células, demonstrando que o DNA, tanto do cinetoplasto quanto o nuclear, são rapidamente degradados após a morte do parasito. Assim, o DNA, quando detectado, representa, na sua imensa maioria, parasitos intactos e viáveis.

O alto desempenho da PCR vem sendo confirmado em inúmeros estudos. Dentre eles, o de Moreira et al (2007) que mostraram detecção de *Leishmania* em aspirado de linfonodo em todos os casos sintomáticos, em 96% dos cães oligossintomáticos e 95% dos assintomáticos contra 75%, 32% e 39% pelo exame direto, respectivamente. Nesse mesmo trabalho, a PCR também foi mais sensível se comparada à imunoistoquímica e imunofluorescência direta. Outros trabalhos também demonstraram maior sensibilidade e especificidade do teste quando comparado à sorologia (Solano-Gallego et al., 2001) e excelente desempenho, em especial quando do uso da PCR em tempo real (Francino et al., 2006; Martínez et al., 2011).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Embora a PCR seja muito sensível, específica e venha mostrando resultados superiores à sorologia, a maioria dos resultados obtidos através do diagnóstico molecular da LVC é oriunda da análise de aspirado de medula óssea e linfonodo, biópsias de pele ou mesmo do sangue periférico (Lachaud et al., 2002; Quaresma et al., 2009; Martínéz et al., 2011; Ferreira et al., 2012; Almeida et al., 2013). O sangue periférico é amostra menos invasiva em relação ao aspirado de tecidos linfóides e biópsias de pele, mas possui inibidores que podem afetar o resultado do teste molecular. Além disso, a carga parasitária encontrada no sangue normalmente é menor do que a das demais amostras citadas diminuindo a chance do encontro de um resultado positivo, o que desestimula seu uso nas reações de PCR (Rethingher et al., 2002a).

Um dos fatores limitantes do emprego de uma técnica diagnóstica em larga escala refere-se à coleta do material clínico que, de forma ideal, deve ser simples, rápida e indolor. Assim, entende-se que a associação da PCR com amostras não invasivas poderia representar uma contribuição importante para o diagnóstico da LVC.

Mais recentemente, as células epiteliais esfoliativas da mucosa conjuntival surgiram como amostra não invasiva a ser usada na detecção de DNA de *Leishmania* pelos bons resultados observados (Francino et al., 2006; Ferreira et al., 2008; Leite et al., 2010; Ferreira et al., 2012; Lombardo et al., 2012; Leite et al., 2015). No entanto, há possibilidade de rechaço do animal

durante o raspado conjuntival e eventual dano à córnea durante o procedimento.

Uma amostra de mais fácil coleta, indolor e sem dano algum ao paciente que poderia ser utilizada no diagnóstico molecular da infecção canina refere-se às células da mucosa oral ou saliva. Recentemente, o estudo indiano de Vaish et al. (2011) demonstrou pela primeira vez a detecção de DNA de *Leishmania* sp nas células da mucosa oral em 83% dos casos humanos com LV. No mesmo ano, Galai et al. (2011) verificaram presença de DNA do parasito na saliva de 94,6% das crianças com doença patente.

Contudo, somente dois estudos, mais recentes ainda, avaliaram o valor do swab oral no diagnóstico canino. Lombardo et al. (2012) foram os primeiros a investigarem a presença do DNA de *L. (L.) infantum* na mucosa bucal de cães e os resultados foram desencorajadores quando comparados ao swab conjuntival e linfonodo, em oposição à Ferreira et al. (2013) que obtiveram ótimos resultados com o swab oral numa população de cães sintomáticos no Brasil, o que demanda maior aprofundamento sobre o valor do swab oral. É importante também que se inclua na análise os cães assintomáticos, já que prevalentes em áreas endêmicas, e a sorologia e o exame direto, o mais prático e rápido dentre os parasitológicos, falham em detectar a infecção nessa população.

OBJETIVO

3. OBJETIVO

A proposta do presente estudo foi investigar o valor do swab oral (SO) na detecção de *L. (L.) infantum* em cães assintomáticos e sintomáticos oriundos de áreas endêmicas, através do uso da PCR em tempo real, considerada a mais sensível dentre as técnicas moleculares. Para tanto, comparamos sua positividade com a encontrada em outra amostra não invasiva (swab conjuntival), pouco invasiva (sangue periférico) e invasiva (aspirado de linfonodo) e também com a sorologia, levando-se em consideração os grupos clínicos, a carga parasitária, índices de concordância entre os resultados, e a combinação dos resultados das diferentes amostras e a sorologia com aqueles obtidos no SO.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

As coletas das amostras caninas foram realizadas de acordo com as normas da Lei N°11.794-8 de 08 de outubro de 2008 sobre Procedimentos para o Uso Científico de Animais e após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, n° 375/12 em 07/11/2012 (Anexo I).

4.1. Áreas de estudo

Os animais que fizeram parte desse estudo originaram-se de três municípios do Estado de São Paulo: Araçatuba, no noroeste do Estado, região com soroprevalência de LVC entre 12% (Camargo-Neves, 2004) e 42,2% (Nunes et al., 2008); Andradina, região administrativa de Araçatuba, que apresenta também alta endemicidade (Rangel et al., 2013) e Embu das Artes, um dos municípios pertencentes a Grande São Paulo, com confirmada transmissão canina e sem casos humanos (Sucen, 2005; Rangel et al., 2013).

4.2. Critério de inclusão e origem dos animais

Adotou-se como critério de inclusão cães com infecção confirmada pelo encontro do DNA de *Leishmania* no linfonodo e/ou sangue e/ou swab bucal e/ou swab conjuntival. Assim, de uma população de 106 animais, 92 cães foram selecionados para o presente estudo. Esta população incluiu animais de ambos os sexos com idades e raças distintas, 63 deles oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, 23 animais provenientes de clínica

veterinária particular do município de Andradina e 06 oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de Embu das Artes.

4.2.1. Exames físicos e laboratoriais

Todos os animais foram submetidos ao exame físico e os dados foram registrados em formulário padrão (Anexo II). Os sinais clínicos investigados foram: perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, epistaxe, alterações oculares, lesão oral e manifestações dermatológicas.

Os níveis de proteína total (Bioclin, Brasil), creatinina (Laborclin, Brasil) e ureia (Laborclin, Brasil) foram mensurados no soro de todos os cães, tomando-se como valores de referência os descritos por Kaneno et al. (1997).

4.2.2. Grupos clínicos

Os animais foram classificados em dois grupos, sintomáticos (n=62) e assintomáticos (n=30), de acordo com o exame físico e o perfil bioquímico sérico.

4.3. Amostras clínicas

4.3.1. Coleta do material biológico

Sangue: o sangue periférico foi obtido por punção venosa ou intracardiaca, utilizando-se tubos a vácuo contendo EDTA (Vacutainer® K2-BD, Nova Jersey, USA) para a realização da qPCR e tubos sem anticoagulante (Vacutainer® Serum- Greiner Bio-One, Americana, Brasil) para a posterior

separação do soro e realização dos testes sorológicos e bioquímicos. O sangue total e o soro foram armazenados à -20°C até o uso.

Células epiteliais esfoliativas da mucosa oral: as células foram obtidas através da raspagem da mucosa bucal (face direita e esquerda, incluindo a gengiva) com swabs de rayon estéreis (Rayswab – INLAB Diagnóstica - Diadema, Brasil). As hastes plásticas foram cortadas e as pontas dos swabs foram armazenadas em 200 µL de tampão de preservação NET (0 NaCl à 15 M, EDTA à 50 mM, Tris-HCl à 0,1M; pH 7,5) e mantidas a 4°C por no máximo sete dias até o uso.

Células epiteliais esfoliativas da conjuntiva: foi usado o mesmo procedimento para a coleta das células da mucosa oral, ou seja, usando-se o mesmo tipo de swab para o raspado da pálpebra inferior do olho direito e esquerdo. As células aderidas ao swab foram mantidas a 4°C em tampão NET por no máximo sete dias até o uso.

Linfonodo: realizou-se punção aspirativa de linfonodo da região cervical ou popliteal (o mais palpável) com seringa de 10 mL e agulha 25x7 mm. O material foi transferido para um microtubo estéril contendo tampão de preservação NET e mantido a 4°C por no máximo sete dias até o uso.

4.4. Diagnóstico Sorológico

4.4.1. Teste rápido (TR) DPP® Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos

O teste rápido DPP® Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil) emprega uma proteína de fusão com os

antígenos recombinantes K26 e K39 para a detecção de anticorpos de cão para *Leishmania* e é fornecido na forma de kit (Figura 6).



Figura 6. Kit teste rápido DPP® Leishmaniose Visceral Canina da Bio-Manguinhos, composto por uma placa branca (plataforma de duas vias-Dual Path Platform) contendo a proteína recombinante de *Leishmania chagasi* e a proteína A conjugada ao ouro coloidal, adsorvidos em membranas de nitrocelulose, e um Tampão de Corrida.

O TR DPP® foi realizado com os soros dos 92 cães. Para o teste foram aplicados 5µL de soro do cão juntamente com duas gotas do tampão de corrida no poço superior da plataforma (AMOSTRA + TAMPÃO), aguardando-se cinco minutos. As linhas azul (teste) e verde (controle), que estão presentes na janela do resultado, devem desaparecer após esse tempo.

Em seguida, foram aplicadas quatro gotas do tampão de corrida sobre o poço inferior, com incubação por dez minutos a temperatura ambiente. Ao final desse tempo, foi realizada a leitura visual obtendo-se o resultado (Figura 7).

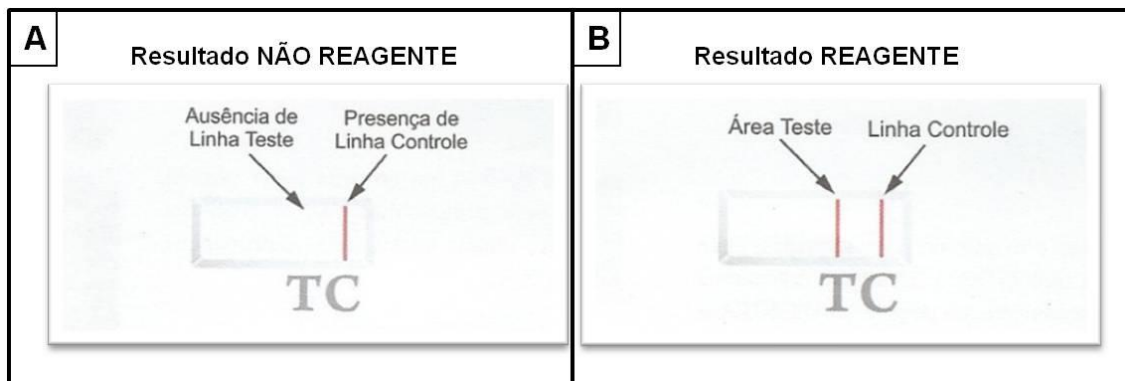


Figura 7. A. Um resultado **não reagente** é indicado por uma linha rosa/roxa na área C (Controle) e nenhuma linha na área T (Teste), sugerindo a ausência de anticorpos para *Leishmania* na amostra. **B.** Um resultado **reagente** é indicado pela detecção de duas linhas rosa/roxa nas áreas C (Controle) e T (Teste), mostrando presença de anticorpos anti- *Leishmania* no soro investigado. A intensidade da linha na área de Teste (T) varia de claro a muito escuro conforme a concentração de anticorpos específicos.

Os resultados foram interpretados de forma visual de acordo com o protocolo do kit. Além disso, foi realizada uma leitura através do espectrofotômetro específico para a leitura do TR DPP® no Instituto Adolfo Lutz (IAL), local onde os testes sorológicos oficiais recomendados PCLVA foram realizados.

4.4.2. Ensaio Imunoenzimático (EIE) Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos

Utilizamos o kit EIE Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) como teste confirmatório do resultado positivo obtido com o teste rápido DPP®. Inicialmente, foram adicionados os soros dos cães juntamente com os devidos controles positivos e negativos, devidamente diluídos. Uma vez ocorrida a ligação específica antígeno-anticorpo, foi adicionado o conjugado anti-IgG de cão marcado com a enzima peroxidase. Na presença de anticorpos específicos, ocorreu a ligação conjugado-anticorpo que

foi confirmada com a adição da substância cromógena (tetrametilbenzidina - TMB).

A enzima peroxidase em conjunto com o substrato peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formou um composto de coloração azul. Com a adição do ácido sulfúrico (H_2SO_4 - 2M) a reação foi interrompida e a coloração azulada tornou-se amarelada nos casos positivos (reagente); no entanto, nos casos negativos, a coloração permaneceu incolor (não reagente). Os resultados foram avaliados através do espectrofotômetro com comprimento de onda de 450nm.

Após a leitura, foi calculado o valor do Cut-Off (CO) para se determinar os resultados, conforme a fórmula abaixo:

$$CO = XCN \times 2$$

XCN = média da densidade óptica do controle negativo.

Controle Negativo (CN): $\geq 0,050 \leq 0,120$ de densidade óptica (DO)

Controle Positivo (CP): $\geq 0,500$ de DO.

Faixa cinza: DO entre o valor obtido para o Cut-Off e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2.

As amostras foram classificadas de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Cálculo para obtenção do resultado final do EIE LVC Bio-Manguinhos.

AMOSTRA REAGENTE	DO igual ou superior ao Cut-Off
AMOSTRA NÃO REAGENTE	DO inferior ao Cut-Off
AMOSTRA INDETERMINADA	DO entre o Cut-Off e a faixa cinza

DO: densidade óptica

4.5. PCR em tempo real (qPCR)

4.5.1. Procedimentos de extração de DNA das amostras

Células epiteliais esfoliativas da mucosa oral e da conjuntiva

A extração de DNA dos swabs das mucosas foi realizado segundo o protocolo do Kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). Inicialmente foram adicionados 200 µL de tampão de lise *T1* e 25 µL de enzima proteinase K (20 mg/mL) ao microtubo com o swab imerso em tampão de preservação NET. Em seguida, o microtubo foi agitado em vortex duas vezes por cinco segundos e incubado a 56°C por 20 minutos. Após a incubação, o conteúdo do microtubo foi transferido para um novo microtubo estéril e foram adicionados 200 µL de tampão de lise *B3* para a completa lise celular. Para a desproteinização e separação dos ácidos nucleicos foram acrescentados 200 µL de etanol (96-100%) com posterior agitação em vortex por 15 segundos. O sistema de coluna incluso no Kit NucleoSpin® Tissue foi devidamente montado e a suspensão foi adicionada no centro da coluna. Em seguida o sistema foi centrifugado por um minuto a 13.400 rpm. Para a lavagem da membrana de sílica da coluna foram necessárias duas etapas: na primeira foram adicionados 500 µL de tampão de lavagem *BW* e o sistema foi centrifugado por um minuto a 13.400 rpm, na segunda lavagem foram adicionados 600 µL de tampão de lavagem *B5* seguida de mais uma centrifugação por um minuto a 13.400 rpm. O filtrado presente no tubo coletor da coluna foi descartado e uma nova centrifugação a 13.400 rpm por três minutos foi realizada para esgotar o tampão de lavagem da coluna. Para a eluição do DNA, a coluna foi transferida

para outro microtubo estéril de 1,5 mL. No centro da coluna foram adicionados 100 µL de tampão de eluição *BE* aquecido previamente a 70°C. Outra incubação por um minuto à temperatura ambiente e centrifugação a 13.400 rpm por dois minutos foi realizada. Após a finalização da extração, quantificou-se o DNA das células epiteliais esfoliativas das mucosas oral e da conjuntiva, utilizando o aparelho Biospectrometer (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). O DNA foi armazenado no freezer a -20°C até o uso.

Linfonodo

A extração de DNA do aspirado de linfonodo foi realizada segundo o protocolo do Kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). Desta forma, o protocolo foi semelhante ao das células epiteliais esfoliativas da mucosa oral e conjuntival, com exceção da incubação da amostra com 180 µL de tampão de Lise *T1* e 25 µL de enzima proteinase K (20 mg/mL) a 56°C por três horas. O DNA foi armazenado no freezer a -20°C até o uso.

Sangue

A extração de DNA do sangue foi realizada segundo o protocolo do kit Illustra Blood Genomic Prep Mini (GE Healthcare). Inicialmente foram adicionados 20 µL de enzima proteinase K (20 mg/mL) a 200 µL de sangue total e, em seguida, 400 µL de tampão de lise tipo 10. A amostra foi agitada em vortex por 15 segundos e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos para a completa lise das células. O sistema de coluna provido pelo Kit Illustra Blood Genomic foi devidamente montado e a suspensão foi adicionada no centro da coluna. Em seguida, o sistema foi centrifugado por um minuto a

13.400 rpm. Para a lavagem da membrana de sílica da coluna foram necessárias duas etapas, na primeira foram adicionados 500 µL de tampão de lise tipo 10 e o sistema foi centrifugado por um minuto a 13.400 rpm, na segunda lavagem foram adicionados 500 µL de tampão de lavagem tipo 6 com posterior centrifugação por três minutos a 13.400 rpm. Para a eluição do DNA, a coluna foi transferida para um microtubo estéril de 1,5 mL, e no centro da coluna foram adicionados 200 µL de tampão de eluição tipo 5 aquecido previamente a 70°C. O sistema foi incubado por um minuto à temperatura ambiente e centrifugado a 13.400 rpm por dois minutos. Após a finalização da extração, foi realizada a quantificação de DNA do sangue extraído utilizando o aparelho Biospectrometer (Eppendorf) e, em seguida, o DNA foi armazenado no freezer a -20°C.

Culturas de parasitos

A extração de DNA genômico das culturas de parasitos foi realizada segundo as instruções do fabricante do Kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). Inicialmente, 1×10^7 células foram resuspensas em um volume final de 200 µL de tampão de lise *T1*. Em seguida, foram adicionados 25 µL da enzima proteinase K (20 mg/mL) e 200 µL de tampão de lise *B3*. Os microtubos foram incubados a 70°C por 20 minutos para a completa lise celular. Já as demais etapas foram semelhantes à extração das células epiteliais esfoliativas oral e bucal. Ao final do procedimento o DNA foi armazenado no freezer a - 20°C.

4.5.2. Condições de ciclagem da PCR em tempo real (qPCR)

O DNA extraído de todas as amostras coletadas foi submetido ao processo de amplificação utilizando-se os *primers* (iniciadores) LEISH-1: 5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3' e LEISH-2: 5'-ACCCCAGTTTCCCGCC-3' (Francino et al., 2006). O fragmento escolhido para a amplificação refere-se a uma sequência conservada com 120 pares de bases encontrada no DNA dos minicírculos do cinetoplasto de *Leishmania infantum*. O seu elevado número de cópias (~10 mil) em um único parasito proporciona um aumento substancial da sensibilidade do teste.

Foram realizadas reações com volume final de 15 µL contendo 7,5 µL de KAPA SYBR® FAST Universal 2X qPCR MasterMix (Kapabiosystem, Massachusetts, USA), 0,5 µL de cada *primer* com concentração final de 300 nM, 1,5 µL de água ultra-pura (Promega, EUA) e 5 µL do DNA extraído na concentração de 10 ng/ µL. As reações de qPCR ocorreram nas seguintes condições de temperatura e ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos e 35 ciclos a 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por oito segundos para extensão do fragmento. Após a ciclagem, a curva de dissociação (*melting curve*) foi gerada e analisada para validar os resultados obtidos. Para quantificar a carga parasitária nas amostras clínicas, uma curva padrão foi gerada com diluições seriadas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/72/cepa 46) entre $0,5 \times 10^6$ a $0,5 \times 10^{-4}$ / µL. As amplificações foram realizadas em duplicata para cada amostra, cada concentração de parasitas e controle negativo. A carga parasitária foi obtida pela plotagem dos valores dos Cts (*cycle threshold*) contra as concentrações padronizadas de parasitas.

4.5.3. Especificidade da qPCR com o uso dos *primers* LEISH 1 e LEISH 2

Para determinar a especificidade da reação com os *primers* LEISH-1 e LEISH-2, utilizou-se DNA de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/ BR/72/LD46), *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1995/M15280), *Leishmania (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533), *Leishmania (V.) shawi* (MCEB/BR/1984/M8408), *Leishmania (V.) lainsoni* (MHOM/BR/1981/M6426), *Leishmania (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147) e *Leishmania (V.) lindenberg* (M15733) e de *Trypanosoma cruzi*, cuja cultura foi cedida gentilmente pelo Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

A ferramenta *Primer-Blast* também foi utilizada para verificar possível anelamento dos primers com sequências de nucleotídeos do DNA de *Neospora caninum*, *Babesia canis*, *Toxocara canis* e *Ehrlichia canis*.

4.6. Análise Estatística

Os dados foram avaliados inicialmente quanto à sua normalidade pelo teste D'Agostino-Pearson. Testes não paramétricos de Mann-Whitney, exato de Fisher e correlação de Spearman foram utilizados. O índice Kappa foi empregado para avaliar a reprodutibilidade e concordância dos resultados dos testes moleculares obtidos nas diferentes amostras (duas a duas) e com a sorologia. Diferenças foram consideradas significantes se $p \leq 0,05$. Os cálculos foram realizados com o uso dos softwares GraphPad Prism 5.0 e BioEstat 5.0.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Especificidade da qPCR com os *primers* LEISH-1 e LEISH-2

A temperatura de dissociação (*Temperatura de Melting* - Tm) da dupla fita de DNA foi usada para avaliar a especificidade da reação de qPCR para *Leishmania (L.) infantum* com os *primers* escolhidos, LEISH-1 e LEISH-2. Para tanto, foram realizadas reações com outras sete espécies de *Leishmania* acima descritas e *Trypanossoma cruzi* (Figura 8).

Todas as reações de PCR em tempo real realizadas com as amostras dos 92 animais mostraram Tm compatível com *L. (L.) infantum*.

A ferramenta *Primer-Blast* mostrou que não há anelamento dos *primers* LEISH-1 e LEISH-2 com sequências de nucleotídeos do DNA de *Neospora caninum*, *Babesia canis*, *Toxocara canis* e *Ehrlichia canis*.

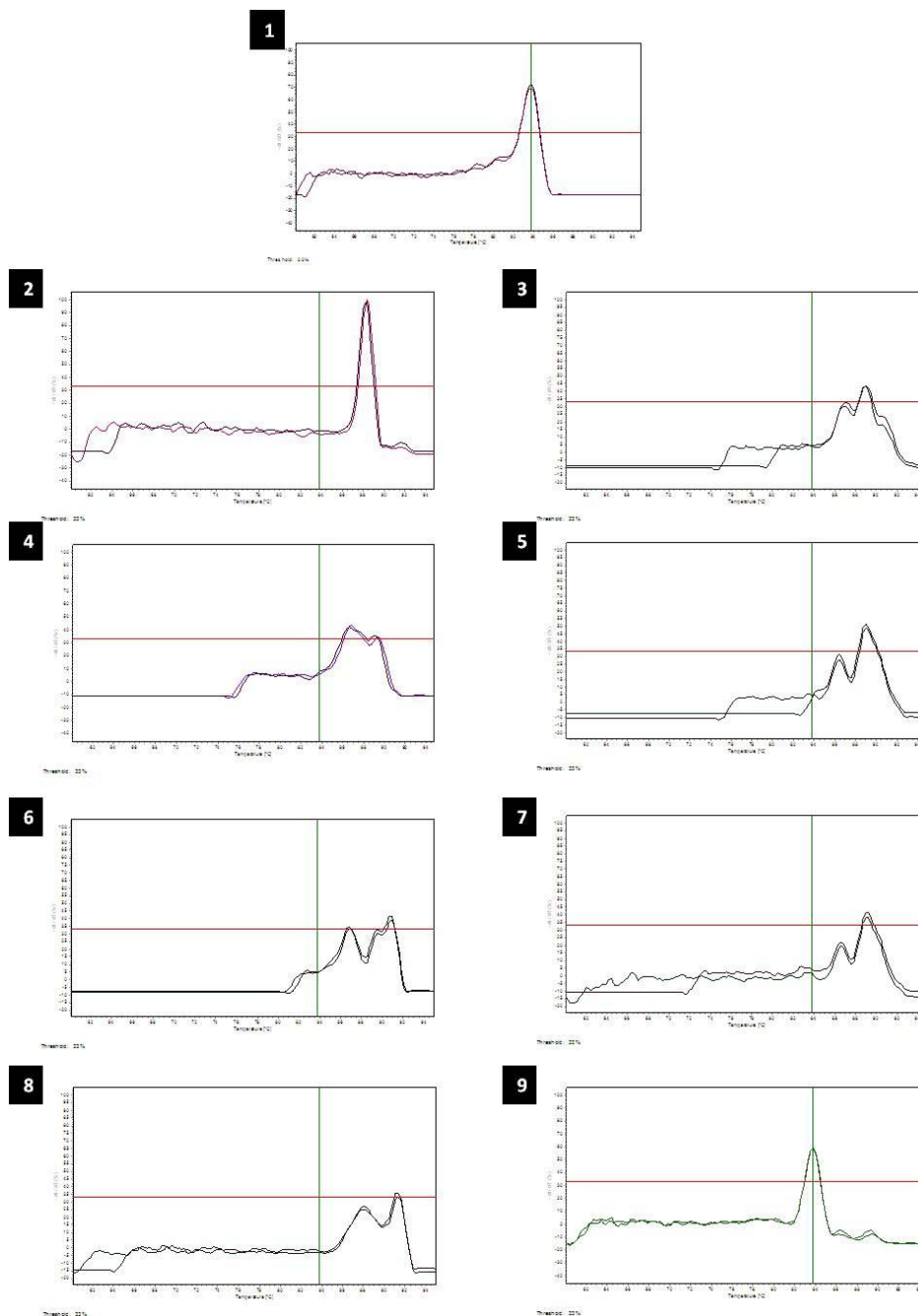


Figura 8. Representação gráfica das temperaturas de dissociação (T_m) obtidas com DNA de oito espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) em duplicata, com o uso dos *primers* LEISH-1 e LEISH-2.

1- *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/ BR/72/LD46); 2- *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269); 3- *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1995/M15280); 4- *Leishmania (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533); 5- *Leishmania (V.) shawi* (MCEB/BR/1984/M8408); 6- *Leishmania (V.) lainsoni* (MHOM/BR/1981/M6426); 7- *Leishmania (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147); 8- *Leishmania (V.) lindenberg* (M15733); 9- *Trypanosoma cruzi* (cepa Y). A linha verde mostra a T_m obtida com *L. (L.) infantum*.

Denota-se a obtenção de Tm com pico único apenas com *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/72/cepa 46), *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) e *T. cruzi*. Já as demais espécies resultaram na formação de dois picos durante a dissociação da dupla fita de DNA.

A análise dos valores médios das Tm mostrou que *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/72/cepa 46) se difere em pelo menos dois graus das demais espécies, permitindo sua identificação e distinção com outras espécies de *Leishmania*, exceto com *T. cruzi* (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios das temperaturas de melting (Tm) e desvios- padrão (DP) de oito espécies de *Leishmania* e *T. cruzi* obtidos na qPCR com os primers LEISH-1 e LEISH-2.

	1° pico	2° pico
	Média (°C) ± DP	Média (°C) ± DP
<i>L. (L.) infantum</i>	83,85 ± 0,14	-
<i>L. (L.) amazonensis</i>	88,40 ± 0,14	-
<i>L. (V.) braziliensis</i>	86,50 ± 0,10	88,95 ± 0,07
<i>L. (V.) shawi</i>	86,45 ± 0,07	88,95 ± 0,07
<i>L. (V.) guyanensis</i>	86,60 ± 0,14	89,05 ± 0,07
<i>L. (V.) lainsoni</i>	86,90 ± 0,14	90,70 ± 0,14
<i>L. (V.) naiffi</i>	87,95 ± 0,21	89,20 ± 0,28
<i>L. (V.) lindenberg</i>	89,05 ± 0,07	91,05 ± 0,21
<i>T. cruzi</i>	83,85 ± 0,20	-

5.2. Frequência de positividade da PCR em tempo real (qPCR) no swab oral e outras amostras clínicas

A análise da positividade da qPCR nas diferentes amostras clínicas mostrou que o encontro do parasito foi maior no aspirado de linfonodo, 84,8% (78/92), em relação às demais amostras ($p \leq 0,05$). A positividade foi equivalente no swab oral, 67,4% (62/92), e conjuntival, 68,5% (63/92) ($p > 0,05$). A positividade de ambas as amostras, entretanto, foi maior do que a encontrada no sangue (SG) ($p \leq 0,05$). O sangue mostrou a menor positividade entre as amostras testadas, 52,2% (48/92) ($p \leq 0,05$) (Figura 9).

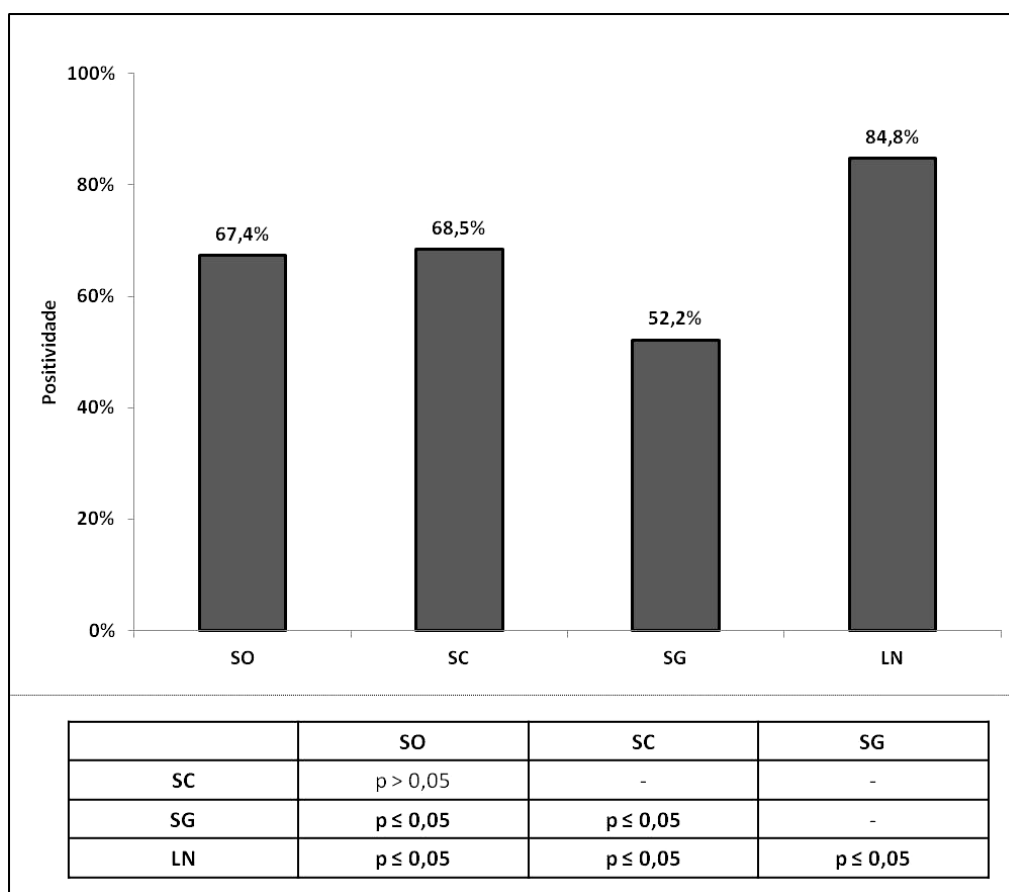


Figura 9. Porcentagem de resultados positivos no swab oral (SO), swab conjuntival (SC), sangue (SG) e aspirado de linfonodo (LN) na qPCR.

*O valor de p foi calculado através do Teste Exato de Fisher.

Considerando os grupos clínicos, cães sintomáticos apresentaram maior positividade em relação aos assintomáticos em todas as amostras clínicas analisadas ($p \leq 0,05$), exceto no sangue ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de resultados positivos nas diferentes amostras obtidos na qPCR no grupo assintomático (GA) e sintomático (GS).

	SO	SC	SG	LN
GA (n=30)	36,7% (11/30)	36,7% (11/30)	60,0% (18/30)	66,7% (20/30)
GS (n=62)	82,3% (51/62)	83,9% (52/62)	48,4% (30/62)	93,5% (58/62)
GA x GS	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,05$	$p > 0,05$	$p \leq 0,05$

* O valor de p foi calculado usando o Teste Exato de Fisher.

Considerando apenas o grupo sintomático (GS), a positividade das amostras não invasivas foi equivalente à encontrada no linfonodo ($p > 0,05$) e maior em relação ao sangue ($p \leq 0,05$) (Tabela 3). Já no grupo assintomático (GA), o linfonodo apresentou maior positividade em relação aos swabs oral e conjuntival ($p \leq 0,05$) e foi equivalente ao sangue ($p > 0,05$) (Tabela 3).

O grau de concordância dos resultados do swab oral com os resultados das outras amostras foi analisado nos 92 cães estudados (Tabela 4). Segundo o valor de *kappa* (K), houve moderada concordância dos resultados do swab oral com a conjuntiva e baixa com as demais (Landis; Koch, 1977).

Tabela 4. Concordância dos resultados do swab oral com as outras amostras e a sorologia.

	SO	
	<i>K</i>	<i>p</i>
SC	0,4	$p \leq 0,05$
SG	0,2	$p > 0,05$
LN	0,3	$p \leq 0,05$
DPP + EIE	0,3	$p \leq 0,05$

SO= swab oral; SC= swab conjuntival, SG= sangue, LN= aspirado de linfonodo.

Teste utilizado: *Kappa de Cohen*.

5.3. Diagnóstico Sorológico

A positividade encontrada no teste rápido DPP® LVC com os soros dos 92 cães foi de 78,3% (72/92) e de 89,1% (82/92) no EIE LVC ($p > 0,05$).

No Brasil, a sorologia oficial utiliza como teste de triagem o teste rápido TR DPP® LVC e todos os casos positivos devem ser confirmados pelo EIE LVC. Utilizando os testes de forma sequencial, como recomendado, a positividade final foi de 78,3% (72/92), uma vez que todos os positivos no TR DPP® LVC também o foram no EIE LVC (Figura 10).

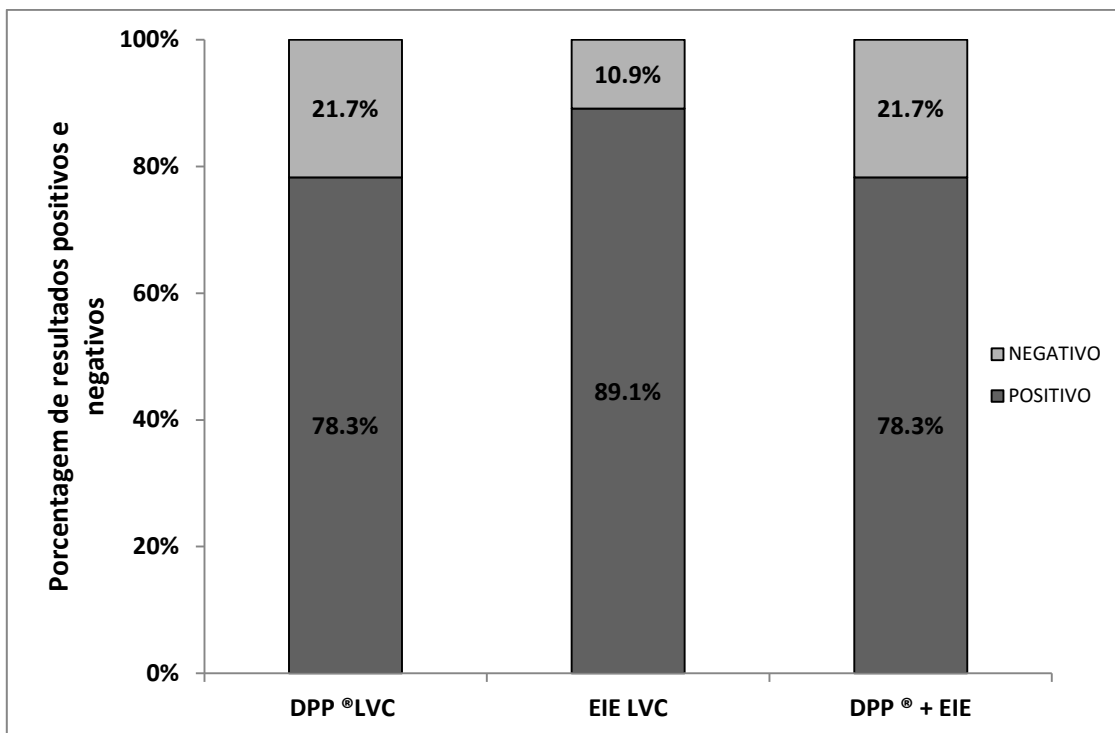


Figura 10. Porcentagem dos resultados positivos e negativos obtida no teste rápido e imunoenzimático com os soros dos 92 cães.

* $p > 0,05$. O valor de p foi calculado usando o Teste Exato de Fisher.

Não houve diferença na taxa de positividade entre os grupos sintomático (82,3%) e assintomático (70,0%) quando os testes foram executados de forma sequencial ou em paralelo (separadamente) ($p > 0,05$) (Figura 11).

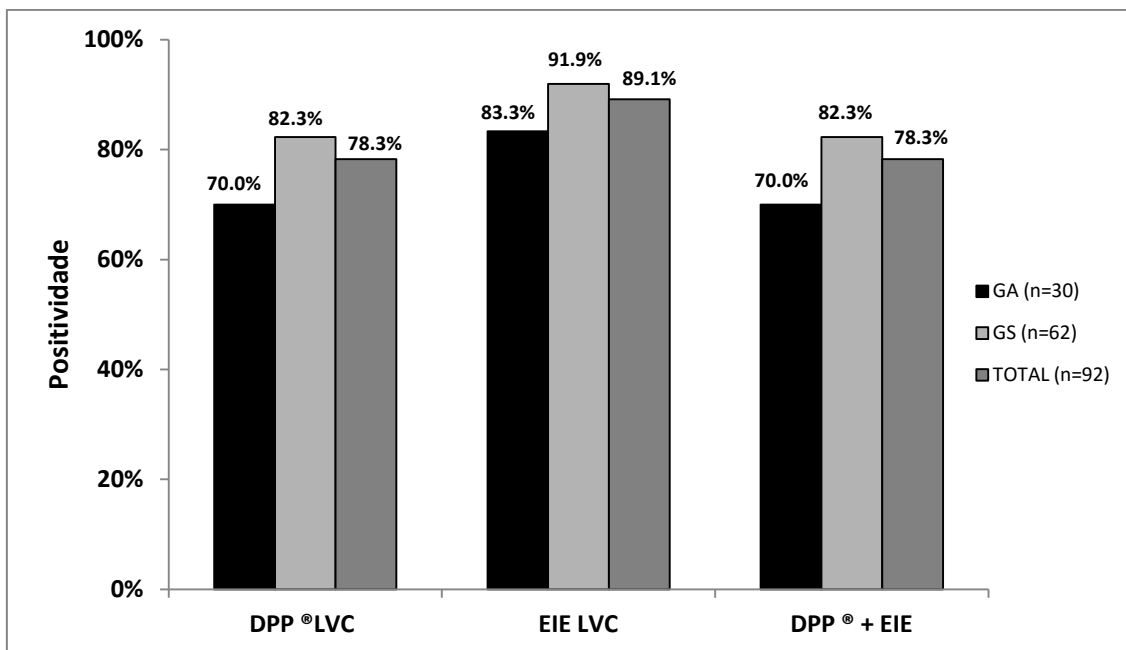


Figura 11. Resultados positivos em cada teste sorológico em relação aos grupos sintomático (GS) e assintomático (GA) comparados ao resultado total.

* $p > 0,05$. O valor de p foi calculado usando o Teste Exato de Fisher.

5.4. Combinação entre os resultados da qPCR e com a sorologia

No intuito de aumentar a positividade do encontro do parasito, os resultados do swab oral foram combinados com os das outras amostras e também com a sorologia oficial (Figura 12).

Todas as combinações aumentaram consideravelmente a positividade em comparação à encontrada quando o swab oral foi usado isoladamente (67,4%). Dentre elas, destacamos a combinação com o swab conjuntival que atingiu 83,7%, de ambos os swabs com a sorologia que atingiu 91,3%, e o máximo de positividade, 94,6%, conseguida com a combinação dos resultados do swab oral com os obtidos no linfonodo (Figura 12).

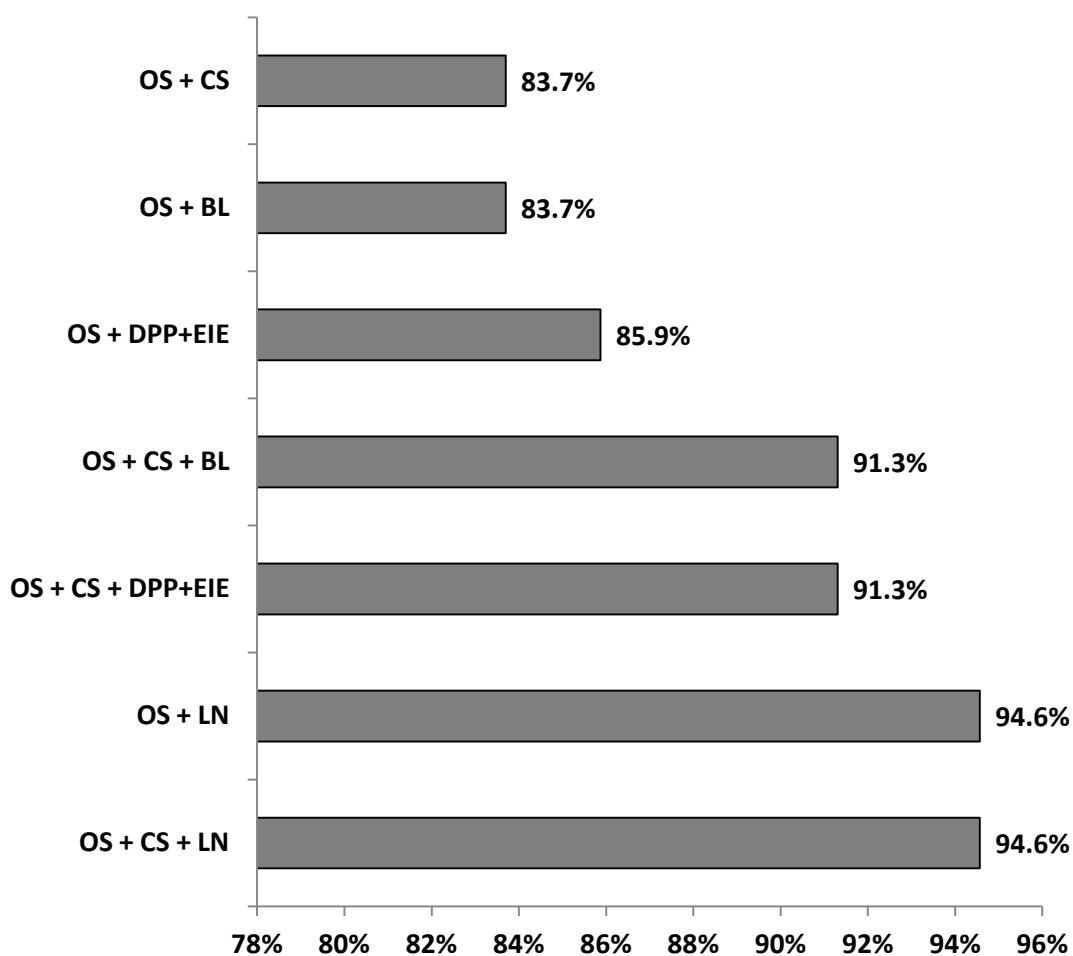


Figura 12. Porcentagem de positividade encontrada em 92 cães pela combinação dos resultados do swab oral com outras amostras e a sorologia.

SO= swab oral; SC= swab conjuntival, SG= sangue, LN= aspirado de linfonodo.

A mesma combinação de resultados foi realizada, focando agora os grupos clínicos (Figuras 13 e 14). No grupo assintomático, onde a detecção do DNA de *Leishmania (L.) infantum* no swab oral foi baixa quando usado isoladamente (36,7%), houve aumento expressivo da positividade na combinação com os resultados do linfonodo (86,7%), quando combinado com o swab conjuntival e DPP®+EIE (83,4%), alcançando patamares aceitáveis na combinação com o swab conjuntival (63,4%) (Figura 13).

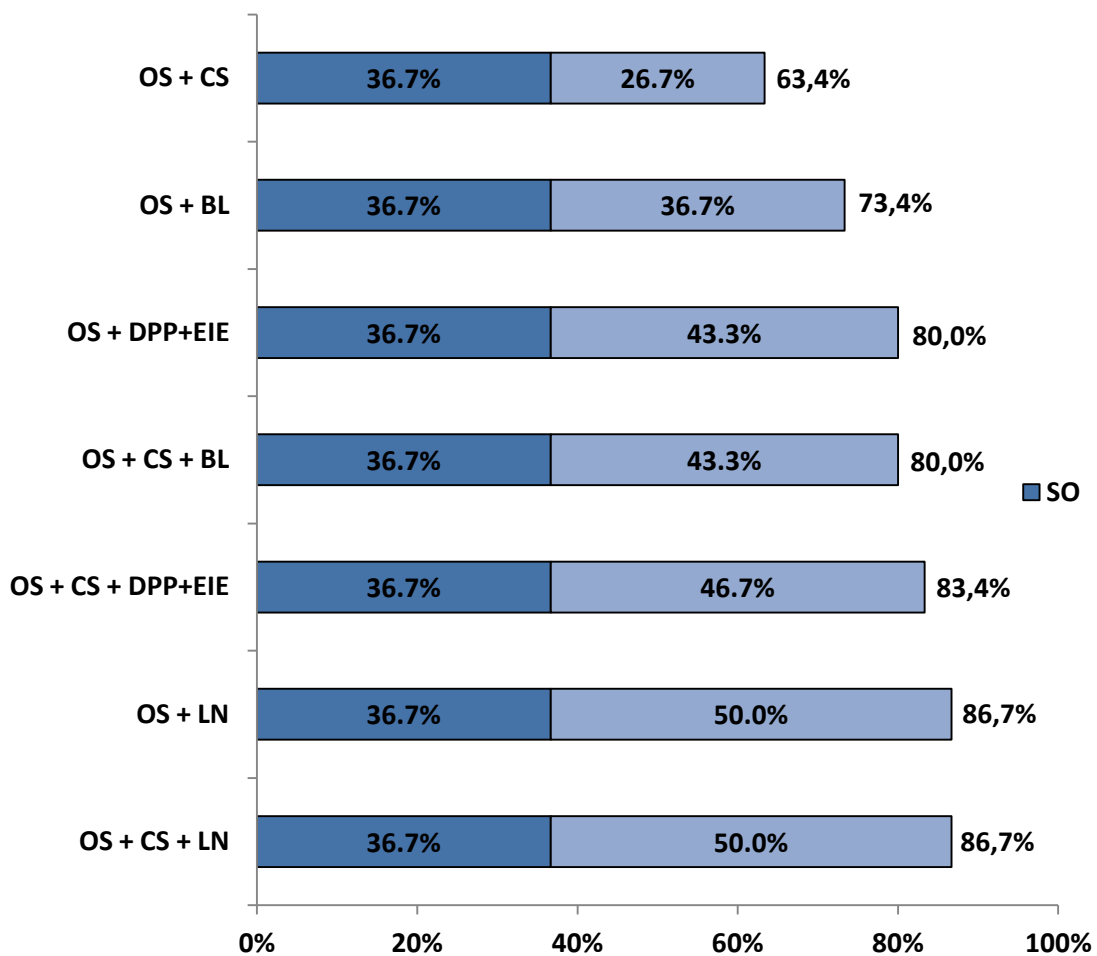


Figura 13. Porcentagem de positividade encontrada nos 30 cães assintomáticos pela combinação dos resultados do swab oral com outras amostras e a sorologia.

SO= swab oral; SC= swab conjuntival, SG= sangue, LN= aspirado de linfonodo.

Nos cães sintomáticos, a sensibilidade da qPCR com o swab oral, já alta (82,3%), aumentou para 93,6% quando combinada ao swab conjuntival, para 95,2% na combinação de ambos os swabs com a sorologia, atingindo seu máximo na combinação com o linfonodo (98,4%) (Figura 14).

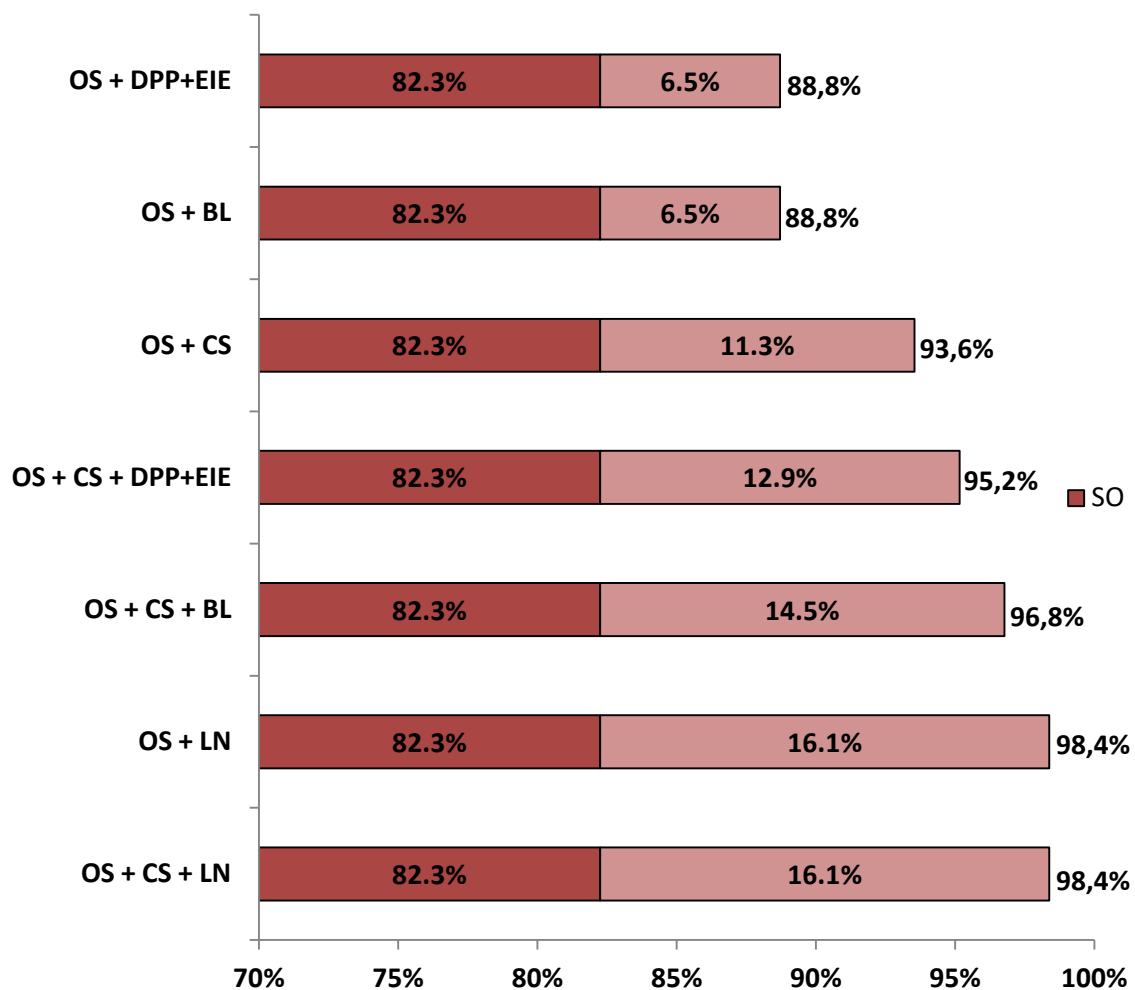


Figura 14. Porcentagem de positividade encontrada nos 62 cães sintomáticos pela combinação dos resultados do swab oral com outras amostras e a sorologia.

SO= swab oral; SC= swab conjuntival, SG= sangue, LN= aspirado de linfonodo.

A tabela 5 mostra a distribuição dos resultados da qPCR e da sorologia, evidenciando os 22 tipos de distribuição encontrados.

Dos 92 cães estudados, todos foram positivos pela qPCR em pelo menos uma das amostras. Salienta-se que o parasito foi detectado exclusivamente no swab oral e no sangue em dois casos (distribuição 14 e 11, respectivamente). O parasito foi encontrado na maior parte dos casos no linfonodo (78/92) e em quatro deles de forma exclusiva (distribuição 4). Apenas sete cães foram simultaneamente positivos pela qPCR nas quatro amostras

(distribuição 3) e 24 mostraram resultados positivos em todos os testes (distribuição 1), incluindo a sorologia.

Tabela 5. Distribuição dos resultados obtidos por qPCR e DPP® + EIE nos 92 cães de área endêmica infectados por *Leishmania (L.) infantum*.

Distribuição	PCR				DPP+EIE	Cães	
	SO	LN	SC	SG		Número	%
1	P	P	P	P	P	24	26.1%
2	P	P	P	N	P	20	21.7%
3	N	P	P	P	P	7	7.6%
4	N	P	N	N	N	4	4.3%
5	N	P	N	N	P	4	4.3%
6	N	P	P	N	N	4	4.3%
7	P	P	N	N	P	4	4.3%
8	N	P	P	N	P	3	3.3%
9	N	N	N	P	P	3	3.3%
10	P	N	N	P	P	3	3.3%
11	N	N	N	P	N	2	2.2%
12	N	P	N	P	N	2	2.2%
13	P	P	N	P	P	2	2.2%
14	P	N	N	N	N	2	2.2%
15	N	P	P	P	N	1	1.1%
16	P	P	N	N	N	1	1.1%
17	P	N	N	P	N	1	1.1%
18	P	P	N	P	N	1	1.1%
19	P	N	P	P	P	1	1.1%
20	P	P	P	N	N	1	1.1%
21	P	N	P	N	P	1	1.1%
22	P	N	P	P	N	1	1.1%

5.5. Carga parasitária nas amostras clínicas

A figura 15 apresenta a distribuição em quartis da carga parasitária absoluta nas diferentes amostras, bem como os valores máximo e mínimo encontrados.

A amostra de linfonodo apresentou maior carga parasitária em comparação às outras amostras ($p \leq 0,05$), e entre os swabs, oral e conjuntival, a carga parasitária foi equivalente ($p > 0,05$). O mais baixo parasitismo foi encontrado no sangue ($p \leq 0,05$).

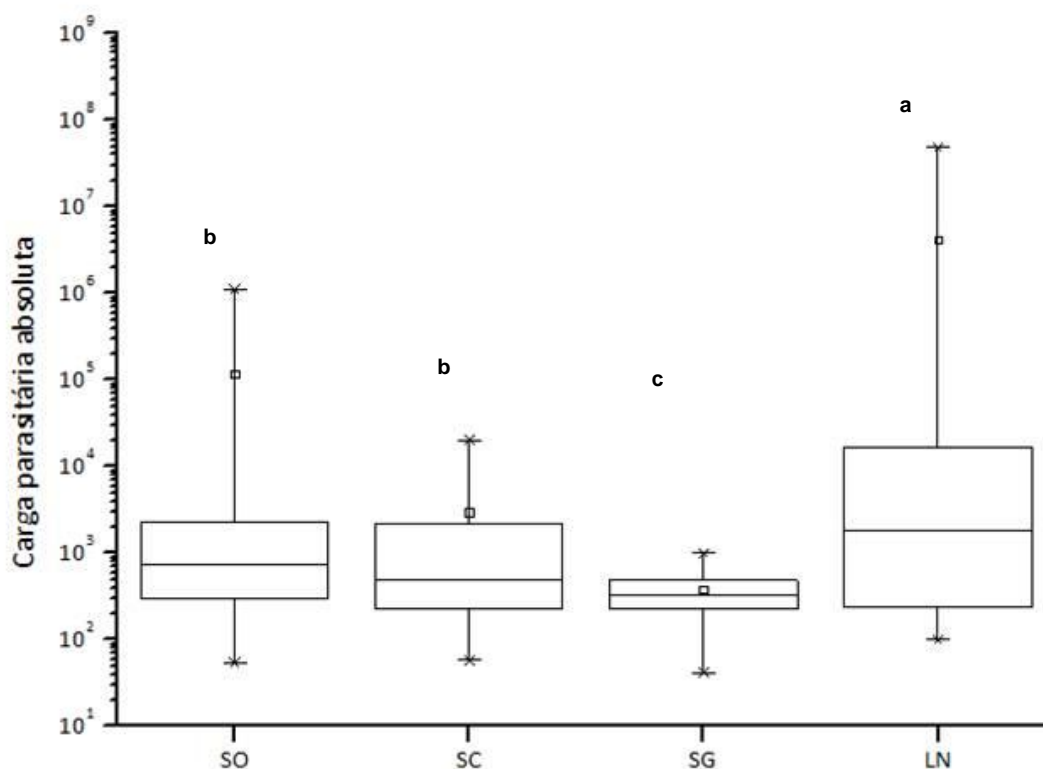


Figura 15. Carga parasitária absoluta nas diferentes amostras clínicas (log10).

SO= swab oral; SC= swab conjuntival, SG= sangue, LN= aspirado de linfonodo.

a: maior carga parasitária em relação as demais amostras ($p \leq 0,05$);

b: cargas equivalentes ($p > 0,05$)

c: menor carga parasitária em relação às demais amostras ($p \leq 0,05$).

O valor de p foi calculado usando o Teste de Mann-Whitney.

Nota-se que a carga parasitária mostrou nítida relação com a frequência de resultados positivos encontrada no diagnóstico molecular qualitativo, ou seja, LN > SO=SC>SG.

Em relação aos grupos clínicos, somente o sangue não evidenciou diferença significativa da carga parasitária entre cães assintomáticos e sintomáticos ($p > 0,05$); para as demais, os animais sintomáticos mostraram carga significativamente maior em relação aos com infecção inaparente ($p \leq 0,05$) (Figura 16).

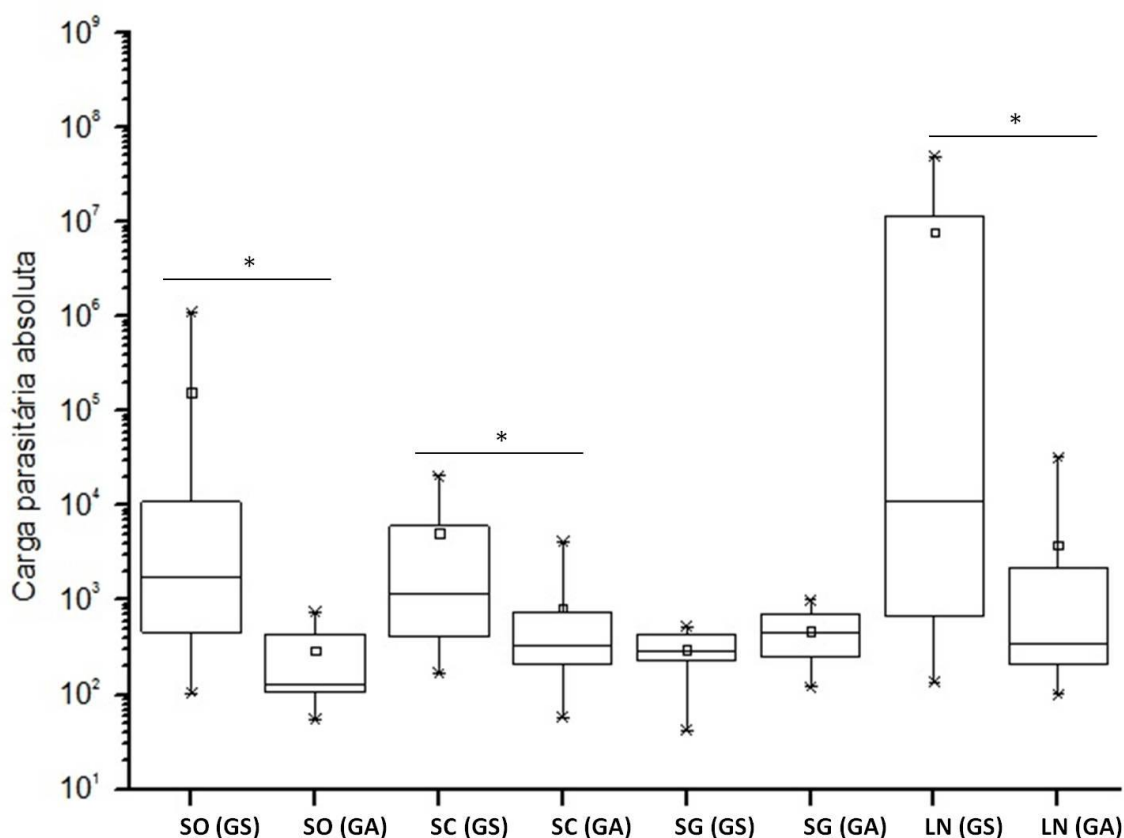


Figura 16. Carga parasitária absoluta (log10) nas diferentes grupos clínicos. SO= swab oral; SC= swab conjuntival, SG= sangue, LN= aspirado de linfonodo. O valor de p foi calculado usando o Teste de Mann-Whitney.

Uma possível correlação entre as cargas parasitárias nos diferentes tecidos (linfonodo, mucosas e sangue) foi também analisada. A tabela 6 mostra

que houve correlação positiva do parasitismo entre as amostras invasivas ($p \leq 0,05$) e do linfonodo com o swab conjuntival ($p \leq 0,05$). A carga do sangue não mostrou correlação com as demais amostras estudadas ($p > 0,05$).

Tabela 6. Correlação da carga parasitária entre as amostras estudadas.

	SO		SC		LN	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
SC	0,5	$p \leq 0,05$	-	-	-	-
LN	0,2	$p > 0,05$	0,4	$p \leq 0,05$	-	-
SG	0,01	$p > 0,05$	0,08	$p > 0,05$	0,1	$p > 0,05$

SO= swab oral; SC= swab conjuntival, SG= sangue, LN= aspirado de linfonodo.

Correlação de Spearman foi o teste empregado para determinar os valores de *r* e *p*.

5.6. Sinais clínicos e positividade da qPCR

Os sinais clínicos para a LVC foram agrupados, de forma arbitrária, de acordo com o número de manifestações presentes em cada cão formando dois grupos, sendo o primeiro grupo denominado S1, onde incluímos somente cães com até dois sinais clínicos e no segundo grupo, denominado S2, cães com três até seis sinais clínicos. Os seis sinais clínicos considerados foram: emagrecimento, onicogrifose, alopecia, sinais dermatológicos outros (crostas, hiperkeratose, nódulos e úlceras), sinais sistêmicos (aumento baço/fígado/linfonodo) e sinais oculares (conjuntivite/secreção). Com esta análise, foi possível comparar a positividade dos resultados obtidos nos testes moleculares e sorológicos em relação à quantidade de sinais clínicos presentes nos cães sintomáticos ($n=62$). Observamos que a frequência dos resultados

positivos foi maior no grupo de animais com maior número de sinais clínicos (S2) para todas as metodologias e tecidos empregados neste estudo ($p \leq 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação entre os sinais clínicos agrupados de acordo com o número de manifestações com os diagnósticos sorológico e molecular.

Clínica	DPP + EIE		SO		SC		SG		LN	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
S1 (n = 17)	15	29,4%*	14	27,5%*	13	25,0%*	2	6,7%*	17	29,3%*
S2 (n = 25)	36	70,6%	37	72,5%	39	75,0%	28	93,3%	41	70,7%
TOTAL	51		51		52		30		58	

* Diferença significativa na taxa de positividade encontrada no grupo S1 em relação ao S2 ($p \leq 0,05$).

O valor de p foi calculado usando o Teste Exato de Fisher.

5.7. Contribuição da qPCR em relação aos resultados negativos da sorologia

Partindo-se do fato que a sorologia é o método diagnóstico mais empregado tanto na rotina clínica como nos inquéritos epidemiológicos, analisamos a contribuição da qPCR realizada com amostras não invasivas, sob a ótica da sorologia, na detecção de infecção nos casos soronegativos (Figura 17).

Vale lembrar que para os dois grupos clínicos analisados, com e sem sinais clínicos, a qPCR foi positiva em pelo menos um tecido, mesmo quando os resultados foram negativos para a sorologia.

De acordo com o organograma representado na figura 17, o swab oral foi positivo em sete (35%) dos 20 casos soronegativos, assim como o swab conjuntival (35%), e ambos (SO+CS) foram positivos em doze (60%). Nos cães assintomáticos (n=9), o swab oral foi positivo em três (33,3%), o conjuntival em um (11,1%), e ambos em quatro (44,5%). A contribuição da qPCR com amostras não invasivas na detecção de infecção nos cães soronegativos também foi evidente no grupo sintomático. Dos 11, quatro (36,3%) e seis (54,5%) foram positivos no swab oral e conjuntival, respectivamente, e ambos (SO+SC) também o foram em oito (72,7%) deles.

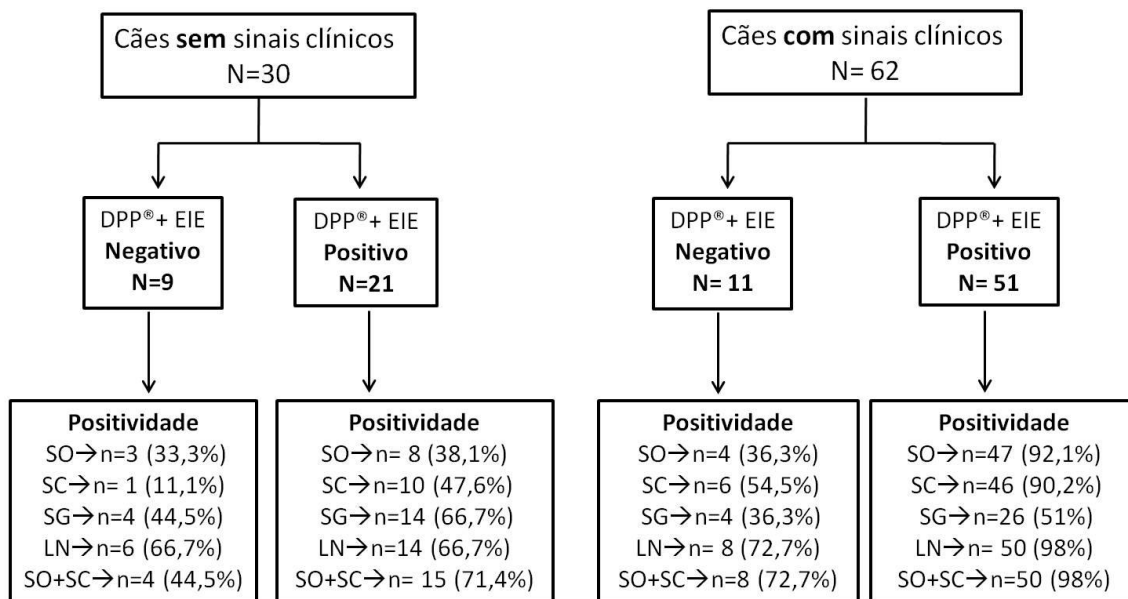


Figura 17. Organograma para a escolha do melhor tecido para utilização da técnica molecular baseada na sorologia e grupos clínicos dos cães.

SO= swab oral; SC= swab conjuntival, SG= sangue, LN= aspirado de linfonodo.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A infecção silenciosa encontrada na maior parte dos cães infectados com *Leishmania (L.) infantum* e a ampla gama de manifestações clínicas dos cães sintomáticos tornam o diagnóstico da LVC um verdadeiro desafio (Alvar et al., 2004 ; Gomes et al, 2008).

Além do exame físico, o diagnóstico se baseia em testes laboratoriais como os sorológicos, parasitológicos e/ou moleculares, utilizados isoladamente ou em combinação, para confirmar a doença em cães com sinais ou anomalias compatíveis com a LVC ou para investigar possível infecção em cães aparentemente saudáveis (Miró et al., 2008).

Dentre os exames laboratoriais, a sorologia tem sido a mais empregada, porém seu desempenho ainda não é ideal, dada a sua baixa sensibilidade em detectar cães assintomáticos e baixa especificidade como um todo, mesmo utilizando-se diferentes técnicas laboratoriais, pois inúmeras reações cruzadas com o soro de cães com outras patologias são frequentemente observadas (Rosário et al., 2005; Porrozzi et al, 2007; Zanette et al., 2014; Laurenti et al., 2014).

Neste sentido, a PCR tem contribuído em muito para o aumento da acurácia diagnóstica da infecção canina (Solano-Gallego et al., 2001; Solano-Gallego et al, 2009) e esforços tem sido feitos para validar seu uso com amostras de fácil coleta, com potencial aplicabilidade tanto na rotina clínica como nos estudos em larga escala. Assim, o presente estudo avaliou o desempenho do swab oral no diagnóstico molecular de cães naturalmente

infectados por *Leishmania (L.) infantum*. Para tanto, comparamos sua positividade com a encontrada em outra amostra não invasiva (swab conjuntival), pouco invasiva (sangue periférico) e invasiva (aspirado de linfonodo) e também com a sorologia, considerando grupos clínicos, carga parasitária, índice de concordância entre os resultados, e a combinação dos resultados das diferentes amostras e a sorologia com aqueles obtidos no swab oral.

Ressaltamos que a PCR em tempo real foi escolhida no presente estudo para detectar o DNA de *Leishmania (L.) infantum* por ser a mais sensível dentre os métodos moleculares (Maia, Campino 2008; Reis et al., 2013), com a vantagem de poder estimar a carga parasitária, aplicável em estudos de seguimento da infecção canina e resposta ao tratamento (Francino et al., 2006, Solano-Gallego et al., 2009).

Francino et al. (2006) desenharam o par de *primers* LEISH-1 e LEISH-2 que permite a amplificação de uma região conservada do DNA dos minicírculos do cinetoplasto de *Leishmania* sp que são encontrados em um alto número de cópias (cerca de 10 mil) por parasito. Nesse estudo, os autores usaram uma sonda na reação para torná-la específica para *Leishmania (L.) infantum*.

No presente estudo, usamos esse par de *primers* nas nossas reações moleculares para aumentar ainda mais a sensibilidade da qPCR, porém substituímos a sonda por SYBR Green para baratear o custo da reação, o que poderia torná-la menos específica. Desta forma, realizamos uma série de reações baseadas na temperatura de dissociação (temperatura de *melting*, T_m) da dupla fita de DNA para avaliar a especificidade da qPCR com os *primers* escolhidos. De acordo com os resultados obtidos (Figura 8), houve a formação

de pico único e com Tm característica que permitiu sua diferenciação das outras espécies do parasito. Ozensoy-Toz et al. (2013) também utilizaram a Tm como critério para a diferenciação entre espécies de *Leishmania* sp, tanto para os agentes etiológicos da leishmaniose visceral como da tegumentar, com sucesso.

Embora o encontro de formas amastigotas em lesões bucais de cães já tenha sido relatado (Parpaglia et al., 2007; Viegas et al., 2012), neste presente estudo demonstramos a presença de DNA de *Leishmania* na cavidade oral de cães sem lesão bucal evidente, de forma semelhante a Lombardo et al. (2012). Em nosso estudo, a positividade do swab oral (67,4%) foi equivalente a do swab conjuntival (68,5%), amostra também não invasiva, maior do que a encontrada no sangue (52,2%), porém menor quando comparada ao aspirado de linfonodo (84,8%) (Figura 9).

Lombardo et al. (2012) realizaram um inquérito em área endêmica de LV canina na Itália, comparando o uso do linfonodo e do sangue com o swab oral e conjuntival. No entanto, diferente dos nossos resultados, a positividade do swab oral foi comparável a do sangue, e bem abaixo da encontrada na conjuntiva e no linfonodo. No outro único estudo que usou o swab oral na investigação da LVC, este foi positivo em 79% dos animais, todos eles sintomáticos. Chama a atenção que essa positividade foi equivalente à encontrada no baço (79%) e pele (68%) dos animais (Ferreira et al., 2013).

No presente estudo, 82,3% dos cães sintomáticos foram positivos no swab oral e 93,5 % no linfonodo (Tabela 3). Nossos resultados mostraram que o swab oral forneceu resultados comparáveis aos obtidos com amostra invasiva (LN) nos animais com sintomatologia, fato bastante positivo, mas não

é amostra que possa ser empregada isoladamente em área endêmica com fins diagnósticos pela baixa sensibilidade na detecção de animais assintomáticos, uma vez que o DNA do parasito foi encontrado em apenas 36,7% dos cães com infecção inaparente (Tabela 3).

Resultados similares foram encontrados em casos humanos em região endêmica da Índia. Através do emprego do swab oral, o DNA do parasito foi detectado em alta proporção nos indivíduos com LV (83,1%) e muito baixa nos indivíduos aparentemente saudáveis (14,1%) (Vaish et al., 2011). Ainda na LV humana, DNA de *Leishmania* foi encontrado em alta proporção (94,6%) no fluido oral (saliva e fluido crevicular gengival) de crianças africanas com doença patente (Galai et al., 2011).

Para que haja uma transmissão sustentada de *Leishmania* em áreas endêmicas, há necessidade da presença do inseto vetor (Quinnell et al., 2009). No entanto, outras rotas de transmissão do parasito, tais como a placentária (transmissão vertical) e sexual (transmissão venérea) já foram comprovadas na leishmaniose canina (Turchetti et al., 2014). Algumas ainda não, como a veiculada por carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*) e pulgas (*Ctenocephalides*), dado que a metaciclogênese não foi verificada no interior desses ectoparasitos, mas somente a detecção de DNA ou RNA de *Leishmania* (Coutinho, Linardi, 2007; Campos, Costa, 2014).

A presença do parasito na mucosa oral aqui detectada pode ter implicações epidemiológicas importantes, especialmente em áreas de transmissão sem ocorrência do inseto vetor. Esse é o caso do município de Embu das Artes. Na nossa casuística, foram incluídos seis animais desse município, todos assintomáticos, e três deles foram positivos (50%) no swab

oral. A presença do parasito na mucosa oral levanta a possibilidade de transmissão deste, cão a cão, por mordidas ou contato direto da saliva do cão infectado com outro cão, hipótese também aventada por outros (Quinnell et al., 2009; Lombardo et al., 2012).

As glândulas lacrimais do cão também são passíveis de infecção, assim como a mucosa conjuntival (Naranjo et al., 2012; Strauss-Ayali et al., 2004; Ferreira et al., 2008; Pilatti et al., 2009; Leite et al., 2010). No presente estudo, o swab conjuntival foi positivo em 68,5% dos cães investigados (Figura 9). Essa taxa de positividade geral foi prejudicada pela baixa positividade encontrada nos casos assintomáticos (36,7%), em contraposição à alta positividade encontrada nos animais sintomáticos (83,9%) (Tabela 3). Em outros trabalhos, a detecção do parasito na conjuntiva de cães sintomáticos ocorreu em 73,9% a 95,6% dos animais (Strauss-Ayali et al., 2004; Ferreira et al., 2008; Pilatti et al., 2009), de forma semelhante ao nosso achado. Entretanto, e de forma surpreendente, Leite et al. (2010) encontraram positividade entre 83,3% e 90% nos animais assintomáticos, dependendo da técnica de PCR utilizada. Ressalta-se que na sua casuística foram inclusos 30 cães de Belo Horizonte (MG), região com alta endemicidade de LVC, todos possuindo sorologia prévia positiva por duas técnicas (ELISA e RIFI). No nosso estudo, os 30 cães assintomáticos não tinham sorologia prévia e 21,7% deles foram negativos pelo DPP®+EIE. Sabe-se que a sorologia falha em detectar parte da população assintomática (Porrozzi et al., 2007), como ocorreu em nosso estudo. Assim, entendemos que Leite et al. (2010) possam ter trabalhado com uma população em estágio mais avançado do processo

infecioso, embora ainda não sintomática, obtendo resultados altos de positividade na mucosa conjuntival.

Por sua vez, o sangue, amostra considerada pouco invasiva, mostrou a menor positividade (52,2%) entre os tecidos estudados (Figura 9) e foi a única a detectar cães assintomáticos (60%) de forma equivalente aos sintomáticos (48,4%) ($p > 0,05$) (Tabela 3), embora com baixa sensibilidade em ambos os casos. Alguns trabalhos obtiveram ótimos resultados ($> 90\%$) na detecção do parasito no sangue (Manna et al., 2004; Cavalcanti et al., 2009), mas outros não como no estudo de Lombardo et al. (2012).

As principais desvantagens em usar o sangue referem-se à presença de inibidores da PCR nesse material e, principalmente, à flutuação da carga parasitária durante o curso da infecção que tende a diminuir nos estágios mais tardios. Esse fato foi observado em um estudo longitudinal conduzido em área endêmica onde cães inicialmente positivos no sangue se tornaram transitoriamente negativos ou permanentemente negativos ao longo de 18 meses, restando poucos animais positivos (18%) ao final do seguimento. Ressalta-se que, nesse mesmo estudo, a sorologia desses animais foi negativa durante todo o período, exceto para um animal que converteu para positivo (Gramiccia et al.; 2010). Nossos dados mostraram certa queda nos valores da positividade no sangue dos cães sintomáticos (48,4%) em relação aos assintomáticos (60%).

De forma inversa, a positividade no linfonodo foi significativamente maior nos cães sintomáticos (93,5%) em comparação aos assintomáticos (66,7%) (Tabela 3). Em relação às outras amostras, a positividade encontrada no linfonodo nos cães com sinais clínicos foi equivalente àquela detectada nas

amostras não invasivas ($p > 0,05$), e maior em relação ao sangue ($p \leq 0,05$). Já no grupo assintomático, o linfonodo apresentou maior positividade em relação aos swabs oral e conjuntival ($p \leq 0,05$) e foi equivalente ao sangue ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Embora estudos prévios relatem elevada positividade nos tecidos linfoides como a medula óssea, baço e linfonodo pela PCR (Almeida et al., 2013; Ramos et al., 2013), a coleta de tais amostras é dolorosa, invasiva e pode oferecer riscos ao animal, sendo necessária a presença de profissionais especializados e bem treinados para este tipo de coleta (Leite et al., 2015).

De acordo com nossos resultados, a carga parasitária do linfonodo foi maior em relação às demais amostras (Figura 15), fato já esperado, uma vez que *Leishmania (L.) infantum* apresenta acentuado tropismo para vísceras e tecidos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (Francino et al., 2006). Além disso, o parasitismo do swab oral foi equivalente ao conjuntival, e este foi maior do que o encontrado no sangue (Figura 15). O sangue, por sua vez, foi a única amostra cujo parasitismo não se diferiu entre os animais sintomáticos e assintomáticos (Figura 16). No conjunto, nossos dados revelam que a carga parasitária está intimamente relacionada ao índice de positividade encontrado no diagnóstico molecular qualitativo.

Os dados do parasitismo acima relatados guardam similaridade com estudos prévios. Ferreira et al. (2013) mostraram que as cargas nas mucosas oral e conjuntival não se diferiram nos cães infectados por *Leishmania (L.) infantum*, e foram menores em relação ao tecido linfóide. Da mesma forma, maior parasitismo no linfonodo em relação ao sangue já foi evidenciado por outros (Francino et al., 2006, Lombardo et al., 2012; Almeida et al., 2013) como

também equivalência na carga parasitária do sangue entre animais sintomáticos e assintomáticos (Quaresma et al. 2009).

Em relação à sorologia, quando os dois testes foram usados na forma sequencial, como preconizado pelo PCLVA, a positividade atingiu 78,3%, sem diferença significativa entre cães sintomáticos e assintomáticos ($p > 0,05$) (Figura 11). Separadamente, o EIE LVC foi positivo em 89,1% dos casos e o DPP® LVC em 78,3% dos animais (Figura 10) e ambos mostraram resultados positivos equivalentes entre os grupos clínicos ($p > 0,05$) (Figura 11), fato que discorda dos achados de Grimaldi et al. (2012b) que demonstraram baixa eficácia do teste rápido DPP® LVC na detecção de cães assintomáticos.

Dado os múltiplos estádios da infecção canina após a exposição ao parasito, a combinação de mais de uma técnica diagnóstica tem sido preconizada para aumentar a sensibilidade de detecção dos cães infectados por *L. (L.) infantum* (Solano- Gallego et al, 2011)

Visando aumentar a sensibilidade de detecção do parasito, especialmente no grupo assintomático, combinamos os resultados do swab oral com o de outras amostras e a sorologia.

A combinação dos resultados do swab oral e conjuntival atingiram patamares satisfatórios (63,4%) no grupo dos animais assintomáticos e muito bons nos sintomáticos (93,6%) (Figuras 13, 14). Levando-se em conta a simplicidade e rapidez da coleta das mucosas oral e conjuntival e considerando a sensibilidade atingida com seu uso combinado, aventa-se sua aplicabilidade no diagnóstico da LVC no presente estudo. Ferreira et al. (2013) também sugeriram o mesmo, como também o processamento conjunto dos swabs para diminuir custos e tempo de processamento das amostras, o que permitiria a

análise dos animais em grande escala. Nesse mesmo estudo, a combinação de resultados da qPCR da mucosa oral e conjuntival atingiu 86% de sensibilidade nos cães sintomáticos, e 93% pela combinação dos swabs oral e nasal (Ferreira et al., 2013).

Melhores resultados ainda foram obtidos na combinação do swab oral com o DPP®+EIE no grupo assintomático (80,0%) (Figura 13), isto porque a sorologia teve um desempenho acima do esperado nesse grupo de animais, o que normalmente não ocorre, mesmo com o uso de testes oficiais adotados no Brasil (Porrozzi et al., 2007; Grimaldi et al., 2012b).

Segundo Leite et al. (2015), a utilização de um teste sorológico rápido associado com a confirmação de um ensaio molecular seria o mais indicado para se detectar cães infectados, tanto assintomáticos como sintomáticos.

No presente estudo, a sorologia foi positiva em grande parte dos animais com comprovada infecção, mas falhou em parte deles. Nos animais sintomáticos soronegativos, o swab oral isoladamente foi positivo em 36,3% dos casos, o conjuntival em 54,5% e, em conjunto, ambos confirmaram infecção em 72,7% dos cães (Figura 17). Já na população assintomática soronegativa, detectou-se o parasito em 44,5% dos animais no swab oral e/ou conjuntival (Figura 17).

Apesar dos custos dos testes moleculares ainda serem elevados, a utilização do diagnóstico molecular deveria ser considerado, dada a sua alta sensibilidade e especificidade.

Sabemos que a distribuição de *Leishmania (L.) infatum* não é uniforme nos diferentes tecidos (Reis et al., 2009). Assim, o uso combinado de diferentes

amostras clínicas pode ser útil para obter-se um diagnóstico conclusivo de um caso suspeito ou mesmo de cães sem infecção aparente.

No presente estudo, mostramos que o uso do swab oral no diagnóstico molecular de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* é bastante promissor, assim como o swab conjuntival. Seu uso isolado ou combinado com o swab conjuntival, que na prática poderiam ser processados juntos, reduzindo custos e tempo, contribuiu para o diagnóstico molecular da infecção canina como também para a sorologia ao detectar presença do parasito nos casos soronegativos.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou grande valor do swab oral no diagnóstico molecular de cães com sintomatologia compatível com LVC, dada a sua alta positividade, equivalente à amostra invasiva, o aspirado de linfonodo, encontrada nos cães sintomáticos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*. No entanto, seu baixo desempenho na população assintomática desabilita seu uso como única amostra a ser investigada. Porém, seu uso combinado com o swab conjuntival ou com a sorologia atingiu patamares satisfatórios na detecção de infecção nessa população canina. A especial contribuição do swab oral ou ambas as amostras não invasivas à sorologia referiu-se ao diagnóstico dos cães soronegativos em ambos os grupos clínicos. Por fim, os nossos resultados mostraram claramente que a combinação de testes e amostras é necessária para a identificação de cães infectados por *L. (L.) infantum*, e que a PCR com o swab oral, especialmente associado ao swab conjuntival, pode contribuir de forma significativa para o diagnóstico da infecção canina, seja ela sintomática ou assintomática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS

Almeida, MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*, v. 127, p. 227–232, 2005.

Almeida AB, Sousa VR, Gasparetto ND, da Silva GF, Figueiredo FB, Dutra V, Nakazato L, Madeira MF. Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 76(3):321-4. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio. 2013.03.017.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 2004; 57:1-88. Review.

Alvar, J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, p.; Cano, J.; Jannin, J.; Boer, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Plos one*, v. 7, p. 1-12, 2012.

Alves WA; Bevilacqua PD. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad Saúde Pública*. 2004; 20(1): 259-65

Boelaert M, Criel B, Leeuwenburg J, Damme WV, Le Rayl D, der Stuyf PV. Visceral leishmaniasis control: a public health perspective. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000; 94(5):465-71.

Boletim Epidemiológico Paulista: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo. São Paulo: BEPA. 2011;8 (96): 32-3.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília/DF. 2014. 1ª. ed., 5. reimpr.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília /DF.2010. 8.^a ed. 277-283p.

Camargo-Neves VLF, Katz G. Leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1999; 32 (Supl.II): 63-4.

Camargo-Neves VLF. A leishmaniose visceral Americana no Estado de São Paulo: situação atual. Bol. Epi. Paulista 2004, 1: 1-4.

Campos JH, Costa FA. Participation of ticks in the infectious cycle of canine visceral leishmaniasis, in Teresina, Piauí, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014;56(4):297-300.

Cavalcanti MP, Felinto de Brito ME, de Souza WV, de Miranda Gomes Y, Abath FG. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. Vet J. 2009;182(2):356-8. DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.05.018.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat Rev Microbiol. 2007; 5(11):873-82.

Costa CH. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cad. Saúde Pública. 2008; 24 (12):2959-63.

Coura-Vital W, Reis AB, Fausto MA, Leal GGdA, Marques MJ, Veloso VM, Carneiro M. Risk Factors for Seroconversion by *Leishmania infantum* in a Cohort of Dogs from an Endemic Area of Brazil. PLoS One. 2013. 8: 71833.

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

Coutinho MT, Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?. Vet Parasitol. 2007;147(3-4):320-5.

Cupolillo E; Brahim LR; Toaldo CB; Oliveira-Neto MP, Brito MEF; Falqueto A, Naiff MF; Grimaldi Jr G. Genetic Polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *Jour. Clin. Microbiol.* 2003. 41(7): 3126-3132.

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2006;48(3):151-6.

Dantas-Torres F. Current epidemiological status of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Rev Saude Publ.* 2006;40(3):537-41.

Desjeux p. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004; 27(5):305-18.

Faria, A. R.; Andrade, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.

Ferreira, M. U.; Foronda, A. S.; Schumaker, T. T. S. O gênero *Leishmania* e as leishmanioses. In: *Fundamentos da Parasitologia Humana*, Manole, Barueri, São Paulo, 1ª. ed., c. 5, p. 37-46, 2003.

Ferreira SA, Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade AS. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2008; 152(3-4): 257-63.

Ferreira SA, Leite RS, Ituassu LT, Almeida GG, Souza DM, Fujiwara RT, de Andrade AS, Melo MN. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012 ;6(4):e1596. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001596.

Ferreira SA, Almeida GG, Silva Sde O, Vogas GP, Fujiwara RT, de Andrade AS, Melo MN. Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013, 7(4):e2150. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002150.

Field V, Gautret P, Schlagenhauf P, Burchard GD, Caumes E, Jensenius M, et al. Travel and migration associated infectious diseases morbidity in Europe, 2008. *BMC Infect Dis.* 2010. 10:330. DOI: 10.1186/1471-2334-10-330.

Fiocruz. Laboratório de Imunomodulação – Departamento de Protozoologia/IOC. As Leishmanioses: morfologia. 1997. Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/morfologia.htm>. [Acesso em 28 de julho 2015]

Foulet F, Botterel F, Buffet p, Morizot G, Rivollet D, Deniau M. Detection and identification of leishmania species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome B gene. *J Clin Microbiol.* 2007. 45(7): 2110-5.

Fraga DB, Solca MS, Silva VM, Borja LS, Nascimento EG, Oliveira GGS, Pontes-de-Carvalho LC, Veras PST, dos-Santos WLC. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease. *Vet Parasitol.* 2012. 190: 591– 594.

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. *Vet Parasitol.* 2006; 137(3-4):214-21.

Galaï Y, Chabchoub N, Ben-Abid M, Ben-Abda I, Ben-Alaya-Bouafif N, Amri F, Aoun K, Bouratbine A. Diagnosis of mediterranean visceral leishmaniasis by detection of leishmania antibodies and leishmania DNA in oral fluid samples collected using an Oracol device. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(9):3150-3. doi: 10.1128/JCM.00267-11.

Galimberti MZ, Katz G, Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Casanova C, Costa IP, et al. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32(1 Suppl):217-8.

Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J.* 2008; 175(1):45-52. Review.

Gramiccia M, Di Muccio T, Fiorentino E, Scalone A, Bongiorno G, Cappiello S, Paparcone 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. *Vet Parasitol.* 2010, 4;171(3-4):223-8. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.03.025.

Grimaldi Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:230–50.

Grimaldi G, Jr., Teva A, Santos CB, Ferreira AL, Falqueto A. The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates. *Am J Trop Med Hyg.* 2012a. 86: 966–971.

Grimaldi G Jr, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto Id, de-Azevedo CT, 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. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012b. 106(1):54-9. DOI: 10.1016/j.trstmh.2011.10.001.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol.* 2006. 135: 100–107.

Kaneko, J. J.; Harvey, J. W.; Bruss, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* Academic Press. 1997, 5^a ed.: 932p.

Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien p. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:210-15.

Lainson R. & Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. Review articles: parasitology supplement. *Nature.* 1978. 237 (22): 595-600.

Lainson, R.; Rangel, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 811-827, 2005.

Laranjeira DF, Matta VL, Tomokane TY, Marcondes M, Corbet CE, Laurenti MD. Serological and infection statuses of dogs from a visceral leishmaniasis-endemic area. *Rev Saude Publica.* 2014; 48(4):563-71.

Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VL, Tomokane TY, Corbett CE, Secundino NF, Pimenta PF, Marcondes M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol.* 2013;196(3-4):296-300. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.03.017.

Laurenti MD, de Santana Leandro MV Jr, Tomokane TY, De Lucca HR, Aschar M, Souza CS, Silva RM, Marcondes M, da Matta VL. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2014; pii: S0304-4017(14)00487-7. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.09.002.

Leite RS, Ferreira Sde A, Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade AS. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Vet Parasitol.* 2010; 170(3-4):201-6.

Leite RS, Souza NA, Barbosa AM, Ferreira ALC, Andrade ASR. Evaluation of conjunctival swab as a mass-screening tool for molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2015; 114:2255–2262. DOI 10.1007/s00436-015-4418-y

Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Migliazzo A, Capri 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. *Vet Parasitol.* 2012; 184(1): 10-7.

Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 2008;158(4):274-87. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.07.028.

Maia-Elkhoury AN, Alves WA, de Sousa-Gomes ML, de Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica.* 2008; 24(12): 2941-7.

Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2004;125(3-4):251-62.

Marcondes M, Lima VM, Araújo MF, Hiramoto RM, Tolezano JE, Vieira RF, et al. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. *Vet Parasitol.* 2013; 197(3-4):649-52. DOI:10.1016/j.vetpar.2013.07.013

Martínez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, Altet L. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasit Vectors*. 2011; 4:57. DOI: 10.1186/1756-3305-4-57.

Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, dos Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Fortes-Dias CL, Dias ES. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol*. 2007; 147(1-2):67-76.

Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniasis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol*. 2008; 24(8):371-7. Review.

Mohebbali M, Taran M, Zarei Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. *Vet Parasitol*. 2004, 121: 239–245.

Montoalvo AM, Fraga J, Monzote L, García M, Fonseca L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección el DNA. *Rev. cuba. med. trop*. 2012. 64 (2): 108-131.

Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol*. 2007; 145(3-4): 245-52.

Naranjo C, Fondevila D, Altet L, Francino O, Ríos J, Roura X, Peña T. Evaluation of the presence of *Leishmania* spp. by real-time PCR in the lacrimal glands of dogs with leishmaniasis. *Vet J*. 2012;193(1):168-73. DOI: 10.1016/j.tvjl.2011.10.001.

Nunes CM, Lima VM, Paula HB, Perri SH, Andrade AM, Dias FE, Burattini MN. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol*. 2008 ;153 (1-2): 19-23.

Ozensoy-Toz S, Culha G, Fadile Yıldız Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan MZ, Vardarli AT, Gunduz C, Ozbel Y. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey. *PLoS Neglected Trop Dis*. 2013. 7(5):e2205.

Pace D. Leishmaniasis. *Journal of Infection*. 2014. 69:10-18. doi: 10.1016/2014.07.016.

Paranhos-Silva M, Freitas LA, Santos WC, Grimaldi G Júnior, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. Am J Trop Med Hyg. 1996; 55(1): 39-44.

Parpaglia ML, Vercelli A, Cocco R, Zobba R, Manunta ML. Nodular lesions of the tongue in canine leishmaniosis. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2007; 54(8):414-7.

Pereira MR, Rocha-Silva F, Graciele-Melo C, Lafuente CR, Magalhães T, Caligiorne RB. Comparison between conventional and real-time PCR assays for diagnosis of visceral leishmaniasis. Biomed Res Int. 2014:639310. doi: 10.1155/2014/639310.

Pilatti MM, Ferreira SDA, de Melo MN, de Andrade ASR. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. Res. Vet. Sci. 2009, 87, 255–257. doi:10.1016/j.rvsc.2009.02.005

Pita-Pereira D, Souza GD, Pereira TA, Zwetsch A, Britto C, Rangel EF. *Lutzomyia* (*Pintomyia*) *fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) a probable vector of American Cutaneous Leishmaniasis: Detection of natural infection by *Leishmania* (*Viannia*) DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. Acta Tropica. 2011; 120:273-75.

Porrozzi R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, Santos CD, et al. 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. Clin Vaccine Immunol. 2007; 14(5):544-8. DOI:10.1128/CVI.00420-06.

Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. Microbes Infect. 2007; 9(11):1307-15.

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

Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 2009; 136(14):1915-34. DOI: 10.1017/S0031182009991156.

Ramos RA, Ramos CA, Jusi MM, de Araújo FR, Machado RZ, Faustino MA, Alves LC. Polymerase chain reaction and real-time PCR for diagnosing of *Leishmania infantum* chagasi in dogs. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2012; 21(3):192-5.

Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(7):937-54.

Rangel O; Hiramoto RM; Henriques LF; Taniguchi HH; Ciaravolo RMC; Tolezano JE; França ACC; Yamashiro J; de Oliveira SS. Epidemiological classification of cities according to the Program of Surveillance and Control of American Visceral Leishmaniasis in the State of São Paulo, updated in 2013. *BEPA*. 2013; 10(111):3-14.

Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*. 2010. 15(10):19505.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009; 128(1-3):87-95. DOI: 10.1016/j.vetimm.2008.10.307.

Reis LE, Coura-Vital W, Roatt BM, Bouillet LÉ, Ker HG, Fortes de Brito RC, Resende Dde M, Carneiro M, Giunchetti RC, Marques MJ, Carneiro CM, Reis AB. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Vet Parasitol*. 2013; 197(3-4):498-503. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.07.006.

Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Counihan H, Espinoza CJ, González JS, Davies CR. *Leishmania* (*Viannia*) spp. dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002a; 96(1):76-8.

Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs: Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. *J Clin Microbiol*. 2002b, 40 (7): 2352–2356.

Rey, L. *Leishmania e Leishmaníases: Os Parasitos*. In: *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2008, 4ª ed., 883p.

Rosário EY, Genaro O, Franca-Silva JC, da Costa RT, Mayrink W, Reis AB, Carneiro M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100(2): 197-203.

Segatto M.; Ribeiro L. S.; Costa D. L.; Costa C. H. N.; Oliveira M. R.; Carvalho S. F. G.; Macedo A. M.; Valadares H. M. S.; Dietze R.; Brito C. F. A., Lemos E. M. Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107(1): 39-47.

Shimabukuro PHF, Galati EAB. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotrop*. 2011; 11:685-704.

Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, de Souza CM, Figueiredo FB. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol*. 2011. 179: 257–261

Solano-Gallego L, Morell p, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(2):560-3. DOI: 10.1128/JCM.39.2.560–563.2001

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau p, Oliva G, Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2009; 28;165(1-2):1-18. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022.

Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau p, Oliva G, Baneth G, The LeishVet Group. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*. 2011; 4:86. DOI: 10.1186/1756-3305-4-86

Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples, for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. *J Infect Dis.* 2004; 189: 1729–1733.

Superintendência de Controle e Endemias Nacionais (SUCEN). Encontro de *Lutzomyia edwardsi* infectada na região da Grande São Paulo. *Rev Saúde Publ.* 2005; 39(1): 137-8.

Turchetti AP, Souza TD, Paixão TA, Santos RL. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries.* 2014; 15;8(4):403-7. DOI: 10.3855/jidc.4108.

Vaish M, Mehrotra S, Chakravarty J, Sundar S. Noninvasive molecular diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(5):2003-5.

Viegas C, Requicha J, Albuquerque C, Sargo T, Machado J, Dias I, Pires MA, Campino L, Cardoso L. Tongue nodules in canine leishmaniasis--a case report. *Parasit Vectors.* 2012; 5:120. DOI: 10.1186/1756-3305-5-120.

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

WHO. The World Health Report. Data needed on people infected with visceral leishmaniasis: call for expansion of working database. Geneva. 2001. Disponível em:

http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/ Acesso em: 21 jul. 2014.

WHO. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. World Health Organ Tech Rep Ser. 2010. 949:1-186.

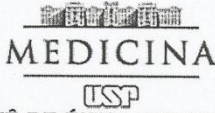
Xavier SC, de Andrade HM, Monte SJ, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MS, Tafuri WL, Tafuri WL. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. 2006; 2: 17.

Zanette MF, Lima VM, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RF, Biondo AW, Marcondes M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum*

chagasi tests in dogs. Rev Soc Bras Med Trop. 2014; 47(1):105-7. DOI: 10.1590/0037-8682-1723-2013.

ANEXOS

9. ANEXO I



MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 07/11/2012, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 375/12 intitulado: **“DESEMPENHO DO SWAB BUCAL NO DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO PARASITO NA AMOSTRA POR PCR EM TEMPO REAL”**, apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.


Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Marcia Dalastra Laurenti
Pesquisador (a) Executante: Mariana Aschar

CEP-FMUSP, 08 de Novembro de 2012.



Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais



Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coodenador
Comitê de Ética em Pesquisa

10. ANEXO II

FICHA CLÍNICA leishmaniose visceral canina		Cidade/origem:	
Identificação cão:			
Idade:		0-2 anos	3-5 anos
			6-mais
Raça ou porte:		Cor:	
		Sim/Não	Observações
Aspecto Corporal	Normal		
	Emagrecido		<i>Intensidade:</i>
	Caquexia		<i>Intensidade:</i>
Sinais oculares	Úlcera de córnea		
	Secreção ocular		
	Outros		
Sinais sistêmicos	Baço		<i>Intensidade:</i>
	Fígado		<i>Intensidade:</i>
	Linfonodos		<i>Localização e intensidade:</i>
Sinais dermatológicos	Nódulo		<i>Localização e número:</i>
	Úlcera		<i>Localização e número:</i>
	Crostas		<i>Localização e intensidade:</i>
	Hiperkeratose		<i>Localização e intensidade:</i>
Pelagem	Alopecia		<i>Localização e intensidade:</i>
	Seca		<i>Localização e intensidade:</i>
	Quebradiça		<i>Localização e intensidade:</i>
Outros	Onicogribose		<i>Intensidade:</i>
	Epistaxe		