UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Julia Cristina Benassi

Detecção de *Leishmania* spp. por PCR em tempo real em amostras de suabe conjuntival de cães, gatos e equinos

---

Pirassununga

2015

Julia Cristina Benassi

**Detecção de *Leishmania* spp. por PCR em tempo real em
amostras de suabe conjuntival de cães, gatos e equinos
VERSÃO CORRIGIDA**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para a
obtenção do Título de Mestre em
Ciências, Programa de Pós-
Graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência
Animal

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

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

B456d Benassi, Julia Cristina
Detecção de *Leishmania* spp. Por PCR em tempo real em amostras de suabe conjuntival de cães, gatos ne equinos / Julia Cristina Benassi. -- Pirassununga, 2015.
74 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Medicina Veterinária.
Área de Concentração: Biociência Animal.
Orientadora: Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira.

1. *Leishmania* 2. PCR em tempo real 3. Suabe conjuntival 4. Cães 5. Gastos 6. Equinos. I. Título.

DEDICATÓRIA

Ao meu doce e fiel amigo Aquiles.

*“O presente é o momento no qual todas as coisas realmente
existem.” Eckhart Tolle*

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo Alexandre, por alguns anos estamos nessa caminhada da vida juntos, foram muitos momentos compartilhados, cada um com seu marco e sua importância para nós e, sem dúvidas, você foi fundamental e essencial para que eu chegasse até aqui. “O amor não precisa ser perfeito, ele só precisa ser de verdade...” (autor desconhecido).

Aos meus pais Cristina e Leonardo e ao meu irmão Juninho, pelo incentivo, paciência e amor incondicional que me fortaleceram no momentos de angústia, ansiedade e medo.

À minha GRANDE FAMÍLIA e aos meus sogros Cristina e Lauro pela compreensão pela ausência e por estarem sempre torcendo para meu sucesso.

À Prof.^a Dr.^a Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira, pela confiança, oportunidade, orientação e, principalmente, amizade.

Aos professores Dr.^a Helena Lage e Dr. Rodrigo Soares, pela ajuda na realização deste projeto e por estar sempre por perto para auxiliar nas instruções de algumas análises.

À Prof.^a Dr.^a Lara Borges Keid, pela compreensão em todos os momentos.

À minha amiga, companheira e parceira Vanessa Figueredo Pereira, pelo incentivo, apoio e ensinamentos. Sua dedicação e amor a pesquisa nos motivam a nunca desistir.

Aos “meus” meninos Bruna, Geovanna, Guilherme, Jéssica, João, Raphael, Renata, pelo apoio, incentivo e compreensão. A amizade de vocês tornou meus dias mais alegres e mais leves.

À minha amiga de trabalho e na vida Andréia, pelo companheirismo, paciência e essencial ajuda em todos os momentos.

Às minhas supers Clau e Ana, por todo apoio, incentivo, paciência e amizade. “Amigo é aquele que aparece quando você menos espera, te ajuda sem você pedir e te ama com todos os seus defeitos.” (Autor desconhecido).

À minha pole mestra Lígia Prezzi, por todo apoio, incentivo, carinho e amizade. “Nem todos os anjos têm asas, às vezes, eles têm apenas o dom de te fazer sorrir.” (Autor desconhecido).

À FAPESP pelo apoio financeiro através do Auxílio nº 13/19821-4

À todos aqueles que direta e indiretamente compartilharam comigo esse momento de grandes desafios, meus sinceros agradecimentos.

"Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante"

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

BENASSI, J.C. **Detecção de *Leishmania* spp. por PCR em tempo real em amostras de suabe conjuntival de cães, gatos e equinos.** 2015. 74f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

O objetivo do presente estudo foi detectar *Leishmania* spp. pela PCR em tempo real (qPCR) em amostras de DNA extraído de sangue e suabe conjuntival de cães, gatos e equinos. E também, verificar a positividade dessas amostras pela PCR convencional (cPCR), utilizando oligonucleotídeos específicos para *L. infantum* (inf.cPCR). Para isso, amostras de sangue e suabe conjuntival de 204 cães, 108 gatos e 54 equinos saudáveis foram testadas pela qPCR para *Leishmania* spp. e os resultados comparados pelo índice *kappa* a resultados de cPCR para *Leishmania* spp. (ssp.cPCR) previamente obtidos. A qPCR de sangue não detectou nenhum animal positivo. Já os resultados da qPCR de suabe conjuntival (qPCR-SC), revelaram 0,98% (2/204) de cães positivos. Ao comparar os resultados obtidos pela qPCR-SC com os resultados obtidos pela cPCR de suabe conjuntival (ssp.cPCR-SC), observou-se uma concordância baixa entre os métodos, $k=0,32$. Em relação aos gatos, 1,85% (2/108) desses animais foram detectados positivos para *Leishmania* spp. pela qPCR-SC, esse resultado corroborou com o resultado obtidos pela ssp.cPCR-SC o que resultou em uma excelente concordância entre os métodos comparados, $k=1$. Em relação aos equinos, 12,96% (7/54) dos animais foram detectados positivos para o parasito pela qPCR-SC. Esses resultados não possuem concordância com os resultados obtidos pela ssp.cPCR-SC, uma vez que por esse método, 66,66% (36/54) foram detectados infectados pela *Leishmania* spp. Ao realizar a inf.cPCR, 11,11% (6/54) dos equinos foram positivos. Submetidas ao sequenciamento, dois fragmentos apresentaram 99% de similaridade com sequencias de *L. infantum* disponíveis no GenBank. Enquanto a qPCR-SG não foi capaz de detectar *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos, a qPCR-SC foi capaz de detectar o parasito nas três espécies avaliadas. A associação entre a qPCR e o uso de um método prático, fácil e não invasivo, como o suabe conjuntival, representa um grande avanço no diagnóstico da doença em cães, gatos e equinos uma vez que, a qPCR-SC, foi capaz de detectar um maior número de animais infectados pela *Leishmania* spp. em relação a qPCR-SG. Além disso, a detecção de *Leishmania* spp. nas diferentes espécies avaliadas reforça a possível atuação desses animais como reservatórios de agentes da leishmaniose cutânea e a confirmação de *L. infantum* em equinos, associado à inexistência de sinais clínicos nestes animais revela a possibilidade de equinos serem reservatórios desse parasito.

Palavras-chave: *Leishmania*, PCR em tempo real, suabe conjuntival, cães, gatos e equinos.

ABSTRACT

BENASSI, J.C. **Detection of *Leishmania* spp. by real-time PCR in conjunctival swab samples from dogs, cats and equines.** 2015. 74f. MSc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

The aim of this study was to detect *Leishmania* spp. by real-time PCR (qPCR) on DNA extracted from blood samples and conjunctival swab dogs, cats and equines. Also, check the positivity of these samples by conventional PCR (cPCR) using specific *oligonucleotídeos* for *L. infantum* (inf.cPCR). For this, blood samples and conjunctival swab of 204 dogs, 108 cats and 54 horses healthy were tested by qPCR for *Leishmania* spp. and the results compared by *kappa* index to cPCR results for *Leishmania* spp (ssp.cPCR). previously obtained. The blood qPCR detected no positive animal. Already the qPCR results of conjunctival swab (CS-qPCR), revealed 0.98% (2/204) of positive dogs. Comparing the results obtained by CS-qPCR with the results obtained by conjunctival swab cPCR (ssp.CS-cPCR), there was a low correlation between the methods, $k = 0.32$. In relation to cats, 1.85% (2/108) of these animals were detected positive for *Leishmania* spp. by CS-qPCR, this results corroborated with the results obtained by ssp.CS-cPCR which resulted in excellent agreement between the methods compared, $k = 1$. Already in horses, 12.96% (7/54) of the animals were found positive for parasites by CS-qPCR. These results not have agreement with the results obtained by ssp.CS-cPCR, since by this method, 66.66% (36/54) were found to be infected by *Leishmania* spp. When performing inf.cPCR, 11.11% (6/54) of the horses were positive. Submitted to sequencing, two fragments showed 99% similarity to *L. infantum* sequences available in the GenBank. While blood qPCR was not able to detect *Leishmania* spp. in dogs, cats and horses, CS-qPCR was able to detect the parasite in the three species evaluated. The association between the use of qPCR and a practical, easy and non-invasive method, such as conjunctival swab, is a great advance in the diagnosis of disease in dogs, cats and horses since CS-qPCR was able to detect a greater number of animals infected with *Leishmania* spp. in respect of blood qPCR. Furthermore, the detection of *Leishmania* spp. the different species evaluated reinforces the possible role of these animals as reservoirs of cutaneous leishmaniasis agents and confirmation of *L. infantum* in equines associated with the absence of clinical signs in these animals reveals the possibility of equines being reservoirs of this parasite.

Keywords: *Leishmania*, real-time PCR, conjunctival swab, dogs, cats, equines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos MC1 e MC2, obtidos pela PCR de diluições seriadas (fator 10) com DNA de *L. infantum*, gerando fragmentos de 447bp. Linha 1 (L1): Padrão 100bp; L2: Controle positivo (*L. infantum*); L3: Controle negativo; L4 a L17: curva padrão, diluições seriadas variando a concentração das amostras de 32,8ng à 0,0032fg, sendo 0,328 a última diluição detectável. – Pirassununga – 2015.....42

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos MC1 e MC2, obtidos pela inf.cPCR-SG de equinos, gerando fragmentos de 447bp. Linha 1 (L1): Padrão 100bp; L2: Controle positivo (*L. infantum*); L3: Controle negativo; L4 a L9: amostras de sangue de equinos positivos na inf.cPCR-SG utilizando oligonucleotídeos MC1 e MC2 para a detecção de Leishmanias do Complexo L. (*L. donovani*) – Pirassununga – 2015.....43

Figura 3 - Curva padrão com diluições seriadas de 5µL de DNA de *L. infantum* MCAN/BR/1984/CCC-17.481, cedida pelo Laboratório de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Realizada pelo aparelho LightCycler 480II da Roche. Pirassununga – 2015.....44

Figura 4 - Curva padrão com diluições seriadas de 1µL de DNA de *L. infantum* MCAN/BR/1984/CCC-17.481, cedida pelo Laboratório de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Realizada pelo aparelho LightCycler 480II da Roche. Pirassununga – 2015.....45

Figura 5 - Relatório gráfico da versão web de BLAST mostrando similaridade de 98% com *L. chagasi* e *L. infantum* de um do fragmento sequenciado.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre os testes spp.cPCR-SC e qPCR-SC de cães positivos pertencentes aos diferentes municípios do Estado de São Paulo.....46

Tabela 2 - Comparação entre os testes spp.cPCR-SC e qPCR-SC de gatos positivos pertencentes ao município de Pirassununga do Estado de São Paulo.....47

Tabela 3 - Comparação entre os testes spp.cPCR e qPCR em amostras de sangue e suabe conjuntival de equinos pertencentes aos município de Bragança Paulista e Ilha Solteira no interior do Estado de São Paulo.....48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 LEISHMANIOSES: PRINCIPAIS CONSIDERAÇÕES	19
3.2 LEISHMANIOSE VISCERAL: PARTICIPAÇÃO DOS CÃES, GATOS E EQUINOS	23
3.2.1 Cães	23
3.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICOS: PRINCIPAIS CONSIDERAÇÕES	29
4 OBJETIVO	33
5 MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 AMOSTRAGEM	34
5.2 REGIÕES DE ESTUDO	34
5.2.1 Bragança Paulista	34
5.2.2 Embu das Artes	34
5.2.3 Ilha Solteira	34
5.2.4 Itapequerica da Serra	35
5.2.5 Pirassununga	35
5.2.6 São Lourenço da Serra	35
5.2.7 São Paulo	35
5.3 ASPÉCTOS ÉTICOS	36
5.4 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO	36
5.5 EXTRAÇÃO DE DNA DE SUABE CONJUNTIVAL E SANGUE	36
5.6 PCR CONVENCIONAL (cPCR)	37
5.6.1 Curva padrão para definição do limiar de detecção do DNA de <i>Leishmania</i> spp. e <i>L. infantum</i>	37
5.6.2 spp.cPCR para detecção do DNA de <i>Leishmania</i> spp.	37
5.6.3 inf.cPCR para a detecção do DNA de <i>L. infantum</i>	37
5.7 ELETROFORESE	38
5.8 PCR em tempo real (qPCR)	38
5.8.1 Validação da qPCR	38
5.8.2 Reação da qPCR	38

5.9 SEQUENCIAMENTO	39
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
6 RESULTADOS.....	41
6.1 ANÁLISE CLÍNICA DOS ANIMAIS	41
6.2 spp.cPCR PARA DETECÇÃO DO DNA DE <i>Leishmania</i> spp.	41
6.2.1 Definição do limiar de detecção da spp.cPCR	41
6.2.2 spp.cPCR para a detecção do DNA de <i>Leishmania</i> spp. em cães, gatos e equinos.....	41
6.2.3 Definição do limiar de detecção da inf.cPCR	42
6.2.4 inf.cPCR para a detecção do DNA de <i>L. infantum</i> em cães, gatos e equinos..	42
6.3.1 Validação da qPCR	43
6.3.2 Resultados da qPCR em cães	46
6.3.3 Resultados da qPCR em gatos	47
6.3.4 Resultados da qPCR em equinos	48
6.4 SEQUENCIAMENTO	49
7 DISCUSSÃO	51
8 CONCLUSÕES	56
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1 INTRODUÇÃO

Embora seja considerada uma das nove doenças infecciosas de maior importância no mundo (ALVAR, et al., 2004), a Leishmaniose Visceral (LV) ainda é listada pela World Health Organization (WHO) como uma das 17 enfermidades mundialmente negligenciadas, afetando grande parte dos países pobres e em desenvolvimento (HOTEZ et al., 2004; HOTEZ et al., 2006).

Dados recentes apontam a LV endêmica em 98 países, dos quais 11 estão na América Latina (WHO, 2014). O primeiro caso descrito no Brasil foi em 1913 no Mato Grosso, região centro-oeste do país. Aproximadamente, 21 anos depois, 41 casos foram identificados em cortes histológicos de indivíduos oriundos das Regiões Norte e Nordeste, com suspeita de febre amarela (BRASIL, 2006). Desde então, estima-se que 90% dos casos registrados nos países Latinos, ocorrem no Brasil. (BRASIL, 2014a).

O agente etiológico da LV no Brasil é a *L. infantum*, (KUHLS, 2011). A principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros mamíferos como os roedores, raposas, tamanduás e marsupiais no ciclo silvestre, é através da picada do inseto fêmea do gênero *Lutzomyia*, que adquire o parasito ao realizar o hematofagismo em animais infectados (ARIAS, et al., 1996; SHAW, 2006). A incidência de LV em áreas urbanas tem sido cada vez maior, podendo estar aliado a isso o fato dos animais silvestres possuírem hábitos sinantrópicos, promovendo a ligação entre os ciclos silvestres e domésticos e a alta adaptabilidade do vetor ao ambiente domiciliar, outro fator importante na cadeia de transmissão da doença (MONTEIRO et al., 2005).

O cão doméstico é apontado como o principal reservatório do parasito em áreas urbanas. Esse hospedeiro, além de desempenhar um papel importante na manutenção da doença urbana, também apresenta variações no quadro clínico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), passando de animais aparentemente saudáveis a oligossintomáticos, podendo chegar a estágios graves, com intenso parasitismo cutâneo (MONTEIRO et al., 2005).

A LV está em fase expansão e urbanização em diversas cidades do Brasil (GONTIJO, 2004). Só no estado de São Paulo, foram registrados pelo Centro de

Vigilância Epidemiológica (2013), 585 casos autóctones, com 49 óbitos no período de 2010 a 2013.

Considerando o aumento no número de casos de LV por todo o estado, aliado a alta adaptabilidade dos flebotomíneos ao ambiente domiciliar, alguns autores sugerem que outras espécies de mamíferos podem ser reservatório da doença. De fato, o trabalho publicado por Vides, et al. (2010), relatou 49,1% (27/55) de gatos positivos para *Leishmania*, em área endêmica no interior São Paulo, sugerindo nesse mesmo estudo, que esses felinos desempenham papel importante na epidemiologia da doença, uma vez que são fonte de infecção aos vetores.

Ainda, infecções por *Leishmania* spp. em equinos também têm sido relatadas em áreas endêmicas para LVC em diferentes regiões da América Latina como: Brasil, Venezuela, Argentina e Porto Rico (BONFANTE-GARRIDO et al., 1981; AGUILAR et al., 1984; RAMOS-VARA et al., 1996). Sendo *Leishmania braziliensis* o agente etiológico normalmente encontrado nesse animal (AGUILAR et al., 1982; AGUILAR, 1985).

Em países da Europa, a leishmaniose equina causada por *L. infantum*, foi registrada não somente em regiões endêmicas (Portugal e Espanha) como em regiões não endêmicas (Sul da Alemanha) (KOEHLER et al., 2002; SOLANO-GALLEGO et al., 2003; ROLÃO et al., 2005; GAMA, 2014).

É evidente que a LV está em expansão, atingindo diferentes espécies de mamíferos e, conseqüentemente, aumentando as chances da infecção humana. Sendo assim, o diagnóstico precoce é importante na redução da incidência da LV.

Dentre as técnicas utilizadas para o diagnóstico da LV e da LVC, o exame parasitológico direto, apesar de possuir sensibilidade baixa, ainda é o mais específico. Neste teste é possível observar formas amastigotas do parasita em esfregaços de linfonodos, medula óssea, aspirado esplênico, biópsia hepática e esfregaços sanguíneos (GENARO, 1993).

As provas sorológicas também são bastante utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose, dentre elas a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a Imunocromatografia, auxiliando na identificação dos portadores assintomáticos e na confirmação do diagnóstico, quando existe a suspeita clínica e não foi possível a visualização do parasita no esfregaço sanguíneo. Mas, apesar de possuir alta especificidade e sensibilidade, esses testes podem gerar muitos resultados falso-positivos ou falso-negativos (SLAPPENDEL;

GREENE, 1990; FERRER et al., 1995; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; OLIVEIRA et al., 2008).

Visando obter uma alta sensibilidade e especificidade na detecção do parasito, a reação em cadeia da polimerase (PCR), tem sido cada vez mais empregada, não só como ferramenta de diagnóstico, mas também no monitoramento e nos estudos epidemiológicos da LVC. Ainda, acrescentando maior eficiência a PCR convencional (cPCR), a PCR em tempo real foi introduzida para detectar e/ou diferenciar as diferentes espécies de *Leishmania* (FRANCINO et al., 2006). Este método tem a vantagem sobre a convencional de produzir resultados rapidamente, reduzindo as várias etapas de manipulação do pós-PCR e, desta forma, reduzindo os riscos de contaminação da amostra e possíveis resultados falsos-positivos (SCHULZ et al., 2003; FRANCINO et al., 2006).

Por meio destas técnicas moleculares é possível a detecção do DNA do parasito em sangue, biópsias de pele, linfonodos, medula óssea e punção esplênica e a utilização de métodos menos invasivos, como o suabe conjuntival tem sido descrita por diversos autores (STRAUSS-AYALI et al., 2004; FERREIRA et al., 2008; PEREIRA et al., 2012, BENVENGA, 2013). Este método consiste na utilização de um suabe estéril para retirada de amostras de células epiteliais da conjuntiva, é um método prático, não requer mão-de-obra especializada, além de ser eficaz na detecção animais positivos, sem sinais clínicos evidentes (PEREIRA et al., 2012, BENVENGA, 2013).

Portanto, a padronização de um método prático e menos invasivo de coleta de amostras, aliado à alta sensibilidade da PCR em tempo real, pode facilitar o diagnóstico da doença e, conseqüentemente, os estudos de morbidade das leishmanioses em cães, gatos e equinos. Estudos estes essenciais para a aplicação e planejamento de estratégias para a profilaxia dessas doenças.

2 JUSTIFICATIVA

O diagnóstico molecular tem sido uma importante ferramenta na detecção da LVC por apresentar alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (MAIA; CAMPINO, 2008; GEISWEID, K., et al., 2013). O DNA parasitário pode ser detectado em diversos espécimes clínicos, no entanto, na medicina veterinária há um grande interesse no uso de amostras que podem ser obtidas de forma não invasiva, como o suabe conjuntival (GEISWEID, K., et al., 2013).

Sendo assim, Benvenga (2013), avaliou a detecção molecular de *Leishmania* spp. em amostras de sangue e suabe conjuntival de cães, gatos e equinos procedentes de regiões endêmicas e não endêmicas para LV do Estado de São Paulo. Nesse estudo, a técnica de PCR convencional (spp.cPCR) foi empregada utilizando oligonucleotídeos iniciadores que amplificam um fragmento conservado do minicírculo do cinetoplasto do gênero *Leishmania* spp., descritos previamente por Rodgers, Popper e Wirth (1990)

Os resultados do estudo revelaram 3,92% (8/204) de cães positivos na PCR convencional de sangue (spp.cPCR-SG) e 1,96% (4/204) de animais positivos na PCR convencional de suabe (spp.cPCR-SC). Ainda nesse estudo, 1,85% (2/108) dos gatos foram positivos na spp.cPCR-SC e nenhum na spp.cPCR-SG. Em equinos, observou-se 100% (54/54) e 66,66% (36/54) de animais positivos na spp.cPCR-SG e spp.cPCR-SC, respectivamente.

Pôde-se observar no estudo de Benvenga (2013), que o suabe conjuntival pode ser uma ferramenta importante em inquéritos epidemiológicos, uma vez que se mostrou eficaz na detecção de *Leishmania* spp. Além disso, os resultados mostram a expansão das leishmanioses pelas cidades do estado de São Paulo, enfatizando a possibilidade de novos reservatórios, gatos e equinos, que podem desempenhar um papel importante na epidemiologia das doenças.

Embora a PCR tenha se mostrado eficaz na detecção de *Leishmania* spp., a PCR em tempo real quantitativo (qPCR) pode ser mais sensível e específica, além de permitir a avaliação da carga parasitária pela avaliação da quantidade de DNA específico na amostra avaliada (DA SILVA, et al., 2010). Assim, a qPCR pode ser utilizada não somente para o diagnóstico, mas também para o monitoramento no tratamento das leishmanioses, além de ser possível detectar infecções recentes, em

fase assintomática (FRANCINO, et al., 2006; MANNA, et al., 2008a; MANNA, et al., 2008b; DA SILVA, et al., 2010).

Considerando o problema da expansão das leishmanioses no Brasil, a identificação de novos reservatórios, aliada à praticidade na coleta de amostras pela utilização do suabe conjuntival e a alta sensibilidade e especificidade da PCR em tempo real, são fatores de extrema importância e colaboração no controle das leishmanioses.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 LEISHMANIOSES: PRINCIPAIS CONSIDERAÇÕES

As Leishmanioses são zoonoses causadas por um protozoário parasita pertencente ao gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae. São conhecidas mais de 20 espécies de grande interesse para a parasitologia médica (NEVES, 2006). Existem três principais formas da doença: cutânea, mucocutânea e visceral, as quais resultam da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro (DE ARRUDA, 2010). Além disso, dentro do gênero *Leishmania*, existem dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, os quais são diferenciados pelo local em que se multiplicam no trato digestório do vetor (NEVES, 2006).

O ciclo biológico do gênero *Leishmania* é heteroxênico, sendo descrita duas formas básicas em seu ciclo, a forma amastigota ou aflagelada presente nos macrófagos dos hospedeiros vertebrados e a forma promastigota ou flagelada, presente no tubo digestivo de insetos hematófagos (flebótomo) (NEVES, 2006). Os flebotomíneos são identificados, principalmente, em regiões peridomiciliares, em áreas de abrigo de animais, lixo e matéria orgânica em decomposição (FELICIANGELI, 2004). No entanto, com a crescente urbanização dos municípios, o vetor está adaptado ao ambiente modificado pelo homem e pode ser encontrado no interior das residências durante o período crepuscular (MARCONDES; ROSSI, 2013).

A principal forma de transmissão do parasito aos hospedeiros vertebrados ocorre pela picada do inseto fêmea. O inseto, ao picar o vertebrado infectado, ingere com o sangue, formas amastigotas presentes nas células do sistema fagocitário mononuclear. No trato digestório do vetor, as formas amastigotas são liberadas dos macrófagos e diferenciam-se em formas flageladas denominadas promastigotas, formas infectantes que se multiplicam e são inoculadas por meio do repasto sanguíneo sobre um novo hospedeiro vertebrado não infectado (BRASIL, 2006; CAMARGO-NEVES, 2006).

A maioria das espécies do gênero *Leishmania*, causa a Leishmaniose Tegumentar ou Cutânea (LT). Essa enfermidade, de evolução crônica, acomete

pele, mucosa e estrutura cartilaginosa da nasofaringe de forma localizada ou difusa. A úlcera típica causada pela doença costuma ser indolor e localiza-se em áreas expostas da pele com formato arredondado ou ovalado, as bordas são bem delimitadas e elevadas com fundo avermelhado e granulações grosseiras. Essas lesões tendem à cura espontânea em período de alguns meses a poucos anos, caso não tratadas. Ao evoluir para a cura, costumam deixar cicatrizes atróficas (CDC, 2014).

Dados recentes da WHO revelam a detecção de, em média, 1 milhão de casos de LT nos últimos 5 anos. Endêmica em 85 países (WHO, 2014), é considerada uma das mais importantes doenças infecciosas pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (BRASIL, 2007). Apesar de descrita como uma infecção de caráter zoonótico, a LT afeta secundariamente o homem, sendo detectada em várias espécies de animais silvestres de hábitos sinantrópicos como os marsupiais, mamíferos endentados e canídeos silvestres (CUPOLILLO et al., 2003; BRASIL, 2007). No ambiente doméstico, infecções em cães, gatos e equinos, são relatadas. No entanto, o papel desses animais como reservatórios das espécies de *Leishmania* que causam a LT, ainda não estão evidenciados, sendo considerados também hospedeiros acidentais da doença (BRASIL, 2007, TRUPPEL, 2014).

Nas Américas, 11 espécies de *Leishmania* são descritas por causar infecções cutâneas em humanos e 8 espécies estão relacionadas com a doença em animais. No Brasil, seis espécies do subgênero *Viannia* e um do subgênero *Leishmania*, são identificadas como agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). As três principais espécies são: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. Recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*, também foram identificadas (DE ARRUDA, 2010).

A ocorrência da LTA no Brasil está geralmente associada a *L. (V.) braziliensis*. Sendo descrita não somente em regiões endêmicas, mas também em regiões de características etiológicas, clínicas e perfil eco-epidemiológico heterogêneos (VEDOVELLO-FILHO, et al., 2008). Infecções em equinos são relatadas desde 1959 (AGUILAR, 1989) em diversos estados como Ceará (ALENCAR, 1959), Bahia (VEXENAT et al., 1986), Rio de Janeiro (AGUILAR et al., 1986), Espírito Santo (FALQUETO et al., 1987), São Paulo (YOSHIDA et al., 1988),

Pernambuco (BRANDÃO-FILHO et al., 2003), Paraná (VEDOVELLO-FILHO et al., 2008) e Minas Gerais (SOARES et al., 2012).

Recentemente, Truppel e colaboradores (2014), avaliaram a detecção de *L. braziliensis* em equídeos de regiões de LTA endêmica no sul do Brasil, por meio de métodos sorológicos e moleculares, concluindo que esses animais estavam infectados pelo parasito, podendo ser fonte infecção aos flebótomos e, conseqüentemente, desempenhar um importante papel na epidemiologia da doença.

Dados do Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, revelam que, nos últimos 20 anos, o número de caso de LT humana vem diminuindo. Ainda assim, foram registrados 18.226 casos somente no ano de 2013. A LTA está fortemente associada a fatores ambientais e modificações antrópicas podem alterar fatores de risco para a transmissão da infecção. Os reservatórios da doença são considerados essenciais nas investigações, para estabelecer os fatores de risco para a transmissão da doença nos locais em que ocorre (TRUPPEL, 2014).

As Leishmanioses mucocutâneas (LMC) referem-se, geralmente, a evolução da LT, a qual resulta na disseminação do parasita da pele para a mucosa naso-orofaríngea. No entanto, lesões de pele e mucosa podem aparecer concomitantemente e em pacientes de infecção cutânea subclínica. Os sintomas iniciais da doença, normalmente se caracterizam por congestionamento e sangramento das mucosas nasais, embora muitas vezes, sintomas orais ou faríngeos são notados primeiro. Quando não tratada, a doença pode progredir para a destruição da mucosa ulcerativa naso-orofaríngea (tais como a perfuração do septo nasal). As espécies de *Leishmania* descritas por causar essa doença são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* e algumas vezes *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (CDC, 2014).

Dentre o conjunto de enfermidades causado pelo gênero *Leishmania*, a LV, em termos gerais, abrange um amplo espectro de gravidade e manifestações (CDC, 2014). É uma zoonose sistêmica grave que atinge o sistema mononuclear fagocitário do homem e animais, acometendo órgãos como baço, fígado, linfonodos, pele e medula óssea (DE ARRUDA, 2010). É causada por espécies do subgênero *Leishmania* pertencentes ao complexo *L. (L.) donovani* (LAINSON, 1987).

Nas Américas, o agente etiológico da LV ainda é discutido, Cunha e Chagas (1937) descreveram *L. chagasi* como responsável pela doença. No entanto, 50 anos após a descrição da *L. chagasi*, Lainson e Shaw (1987) fizeram uma profunda

revisão do gênero e reclassificaram o parasito como membro do subgênero *Leishmania* e descreveram como *L. (L.) chagasi*. No entanto, cepas de *L. (L.) chagasi* isoladas de humanos, cachorros domésticos e da raposa selvagem (*Cerdocyon thous*) em países da América do Sul demonstraram, pela técnica de amplificação ao acaso de DNA polimórfico (RAPD), ser idênticas a cepas de *L. (L.) infantum* originadas de área endêmica para LV em países europeus como Portugal e Espanha. Por essa razão, Mauricio e colaboradores (1999), concluíram que *L. (L.) chagasi* é semelhante a *L. (L.) infantum*. Foi sugerida que a separação entre os parasitos seria melhor a nível subespecífico, como *Leishmania (L.) infantum chagasi* com base em suas características etiológicas, como o habitat silvestre de vetor e seu reservatório vertebrado natural, a raposa selvagem (LAINSON; RANGEL, 2003; LAINSON; SHAW, 2005).

Kuhls e colaboradores (2011), confirmaram que o agente etiológico da LV em países do Novo Mundo, representados por partes do sul dos EUA e México até o norte da Argentina, incluindo países como o Brasil, Paraguai, Bolívia, Venezuela, Suriname, Guiana, Colômbia, Honduras, Panamá, Costa Rica, El Salvador, Guadalupe, Guatemala e Nicarágua, é a *L. infantum* importada diversas vezes do sudoeste da Europa, sendo este o primeiro estudo a analisar pela cPCR a estrutura da população desse parasito nesses países.

Os hospedeiros vertebrados da LV são representados, no ambiente silvestre, pelas raposas e marsupiais. No Brasil, foram descritas duas espécies de raposas naturalmente infectadas: *Lycalopex vetulus* no Ceará (DEANE, 1956); e *Cerdocyuntous* no Pará (LAINSON, et al., 1990) e em Minas Gerais (SILVA, 2000). Na Bahia, *L. infantum* foi isolada em marsupiais do gênero *Didelphis* (SHERLOCK et al., 1984) e no Rio de Janeiro (CABRERA, et al., 2003).

No ambiente urbano, o cão é considerado o principal hospedeiro e fonte de infecção para os vetores. A infecção por *L. infantum* foi descrita pela primeira vez, na Tunísia (NICOLLE, 1908). No Brasil, as primeiras evidências da participação dos cães na epidemiologia da LV foram reveladas em trabalhos realizados pelo Instituto Oswaldo Cruz, no qual foi demonstrada a existência da doença no cão e no homem e a infecção no flebótomo (CHAGAS, 1936; CHAGAS, et al., 1938; CAMARGO-NEVES, 2006), porém apenas em 1955, Deane & Deane (1955) estabeleceu o cão como reservatório da doença ao observar intenso parasitismo

cutâneo e constatar a transmissão entre esses animais, residentes em zona urbana do município de Sobral, CE (CAMARGO-NEVES, 2006).

Apesar de ser considerado o principal reservatório urbano da doença, em algumas áreas, os cães não são preferência alimentar para *Lu. Longipalpis*. Em área de transmissão de LV no Estado de Mato Grosso, Brasil, um estudo objetivando avaliar a preferência alimentar do vetor, observou que a maioria dos flebotomíneos tiveram preferência por aves, roedores e humanos (MISSAWA; LOROSA; DIAS, 2008). Outros estudos revelam que a preferência alimentar dos *Lu. Longipalpis* é determinada pela acessibilidade, abundância, tamanho e biomassa do hospedeiro (QUINNELL; DYE; SHAW, 1992; BERN; COURTENAY; ALVAR, 2010; MARCONDES; ROSSI, 2013), portanto, somado a fatores como o desmatamento e crescimento desordenado dos grandes centros urbanos, a rápida adaptação do vetor ao ambiente propicia a busca por outras fontes de alimentação. Com isso, sugere-se que em algumas regiões, o papel do cão na epidemiologia da doença, causada pela *L. infantum*, pode ser pouco considerável.

3.2 LEISHMANIOSE VISCERAL: PARTICIPAÇÃO DOS CÃES, GATOS E EQUINOS

3.2.1 Cães

O cão é considerado o reservatório urbano primário LV e, as elevadas prevalências observadas nesta população, justificam essa importância na manutenção da endemia. No Iran, a alta densidade de cães soropositivos em algumas localidades, mostrou ser um fator de risco significativo para a soropositividade em crianças (GAVGANI et al., 2002).

Estima-se que, no mínimo, 2,5 milhões de cães estão infectados na Europa (MORENO; ALVAR, 2002; BANETH, 2008). No Brasil, a prevalência de LVC em áreas endêmicas está em torno de 5,9 a 29,8% (FRANÇA-SILVA, et al. 2003; LOPES et al., 2010; LEITE, et al. 2015), onde a alta prevalência da infecção canina está associada ao maior risco da doença em humanos (WERNECK, et al. 2006).

A doença em cães, desde o primeiro registro da sua ocorrência no estado de São Paulo já foi notificada em 45 municípios, ocorrendo em seis regiões administrativas: Araçatuba, Bauru, Marília, Presidente Prudente, Grande São Paulo

e São João da Boa Vista. Em 2013, casos da doença em seres humanos foi registrada em 25 municípios do estado (SÃO PAULO, 2013).

Cães que apresentam a doença podem manifestar diferentes sinais clínicos, lesões de pele são normalmente mais frequentes e podem vir aliadas a outros sinais clínicos ou anormalidades clínico-patológicas como linfadenomegalia generalizada, perda de peso progressiva, atrofia muscular, diminuição do apetite, letargia, esplenomegalia, poliúria, polidipsia, lesões oculares, epistaxe, onicogrifose, claudicação, vômitos e diarreia (CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; BANETH et al., 2008). Entretanto, a doença renal pode ser a única manifestação clínica em cães, podendo variar de proteinúria leve a síndrome nefrótica. A insuficiência renal crônica é a principal causa de mortalidade da LVC, resultado da grave progressão da doença (SOLANO-GALLEGO, et al., 2011).

De acordo com os sinais clínicos apresentados, Mancianti e colaboradores (1988) classificaram os cães em três formas clínicas: Sintomático: em que há sinais clínicos típicos; Oligossintomático: exibem sinais clínicos pouco característicos e a sorologia, em geral, apresenta títulos baixos. Esses cães podem evoluir para a cura ou desenvolver a doença, quase sempre após um longo período de incubação; Assintomático: compreende a maioria dos cães infectados. Não apresentam sinais clínicos na maioria dos casos, porém são positivos em exames sorológicos, parasitológicos e moleculares.

Em 2010, um grupo de pesquisadores propôs uma nova classificação dos cães positivos como ferramenta para a identificação dos animais infectados: Cães Expostos: aqueles que são negativos em métodos diretos, porém apresentam baixo título de anticorpos anti-*Leishmania* nos testes sorológicos e não apresentam sinais associados à doença. Cães Infectados: aqueles em que a presença do parasito é confirmada por métodos diretos e apresentam baixos títulos de anticorpos nos métodos sorológicos. Podem estar saudáveis ou apresentar sinais associados a outras doenças. Cães Doentes: apresentam resultados citológicos positivos, elevados títulos de anticorpos e um ou mais sinais clínicos comuns da leishmaniose. Alterações hematológicas, bioquímicas e urinárias sugestivas da doença, também são observadas. E, finalmente, Cães Severamente Doentes: que além de apresentar resultados positivos nos métodos diretos e sorológicos, ainda apresentam evidências de proteinúria ou insuficiência renal crônica (PALTRINIERI, et. al, 2010).

Solano-Gallego (2011), propuseram um sistema de quatro estágios clínicos: Estágio I (doença branda), Estágio II (doença moderada), Estágio III (doença severa), Estágio IV (doença grave); esses estágios foram classificados de acordo com os resultados sorológicos que variam de negativo a alto nível de anticorpos anti-*Leishmania*, associado aos aspectos clínicos e anormalidades clínico-patológicas.

O entendimento da infecção ou doença em cães é de grande importância para o controle da mesma. Cães que apresentam sinais clínicos severos da doença são incapazes de desenvolver uma efetiva resposta imune celular, mas desenvolvem uma imunidade humoral e podem ser identificados na sorologia. Por outro lado, cães infectados que não apresentam sinais clínicos possuem uma resposta celular eficaz. Porém, também podem ser fonte de infecção para o vetor e, muitas vezes, deixam de ser identificados por não apresentarem sintomas clínicos e também, por serem negativos em exames sorológicos. (BANETH et al., 2008).

Para o controle da LV no Brasil, o Programa do Ministério da Saúde recomenda a eutanásia de cães soropositivos em áreas endêmicas juntamente com o controle da população do vetor, através de pulverização de inseticidas (BRASIL, 2006). Entretanto, tanto as estratégias de controle do vetor quanto a eutanásia dos cães, em alguns casos, não estão associadas à redução do número de casos humanos. De fato, Vieira e Coelho (1998), observaram a eutanásia de 176.000 cães positivos no período entre 1990 a 1997 e mesmo assim 21.021 casos de LV foram registrados no mesmo período (BRASIL, 2014a). Além de a eutanásia ser controversa, o custo destas medidas é alto e gera polêmica quanto à eliminação do reservatório canino.

Desde o final da década de 80 até os dias atuais, o Brasil enfrenta um contínuo aumento nos casos de LV. Cerca de 3.500 casos são registrados anualmente e o coeficiente de incidência é de 2,0 casos/100.000 habitantes. Nos últimos anos, a letalidade vem aumentando gradativamente, passando de 3,1% em 2000 para 7,1% em 2012 (BRASIL, 2014a).

A essa crescente expansão da LV no Brasil e no mundo, Quinnell e Courtenay (2009) sugerem três razões que explicariam o insucesso das estratégias de controle: a falta sensibilidade dos testes de diagnósticos em diferenciar cães infecciosos e não infecciosos, a confirmação de outras vias de transmissão não vetorial e a possível presença de outros reservatórios, sendo esses temas escopo

de diversos estudos que tentam elucidar os principais aspectos da epidemiologia e controle da LV.

3.2.2 Gatos

A participação dos gatos (*Felis catus domesticus*) no ciclo epidemiológico das leishmanioses ainda é considerado incomum. O primeiro relato da LV em felinos ocorreu na Argélia em 1912, sendo o animal residente de uma casa que a LV havia sido detectada em uma criança e um cão (SERGENT, et al., 1912). Desde então, vários casos de LV felina foram descritos na Itália, Brasil, França, Suíça, Espanha, Israel, Portugal e Iran (OZON, et al., 1998; POLI, et al., 2002; RÜFENACHT, et al., 2005; MARTÍN-SÁNCHEZ, et al., 2007; SOLANO-GALLEGO, et al., 2007; AYLLON, et al., 2008; MAIA, et al., 2008; NASEREDDIN, et al., 2008; CERBINO-NETO; COSTA; WERNECK, et al., 2009; HATAM, et al., 2009; SARKARI, et al., 2009).

Infecções por *L. infantum* em gatos são, normalmente, encontradas em áreas onde a doença é endêmica para cães e humanos (PENNISI, 2002). No entanto, o primeiro caso da América Latina ocorreu em uma cidade do interior de São Paulo, Brasil, na qual nenhum caso autóctone em cães e humanos havia sido registrado. Vale ressaltar que o animal apresentava lesão nodular no nariz, perda de peso e linfadenomegalia (SAVANI, et al., 2004).

Embora a leishmaniose felina seja descrita como uma doença subclínica, gatos podem apresentar diversos sinais clínicos. Dentre eles, dermatites ulcerativas, nodulares ou escamosas na cabeça e pescoço, alopecia, linfadenomegalia, perda de peso, alterações oculares (blefarite nodular, uveíte), diminuição do apetite, gengivoestomatite crônica, letargia, desidratação, mucosas pálidas, vômitos, hepatomegalia, febre, icterícia, poliúria, esplenomegalia, corrimento nasal, aborto de repetição e dificuldade de respirar. A associação da infecção por *L. infantum* e o vírus da imunodeficiência felina (FIV) foi descrita em áreas endêmicas. Outras infecções como leucemia felina (*Feline Leukemia Virus* - FeLV), câncer, doenças autoimunes e tratamento com corticoides podem debilitar o sistema imunológico do animal e contribuir para o aparecimento de sinais clínicos. Apesar disso, sugere-se que os felinos podem ser mais resistentes que os cães em desenvolver a doença (PENNISI, et al., 2013).

Ainda que a leishmaniose felina não apresente características clínicas específicas, em estudo realizado por Vides e colaboradores (2010), foi avaliada a relação entre as lesões dermatológicas e a infecção de *L. infantum* em gatos pertencentes a Araçatuba, cidade do interior de São Paulo, endêmica para LV. Dos 55 gatos que apresentavam lesões, 49,1% dos animais foram observados resultado positivo para LV, em pelo menos um dos métodos de diagnóstico aplicados. Com base na forte associação de lesões de pele e leishmaniose, os autores sugerem que, para gatos pertencentes à área endêmica para LV e que apresentam lesões dermatológicas, a detecção de *Leishmania* deve ser incluída como diagnóstico diferencial.

No mesmo estudo, os autores sugerem a associação entre a imunossupressão causada pela FIV e a co-infecção por *L. infantum*, uma vez que, 83,3% dos gatos positivos para FIV apresentaram anticorpos anti-*L. infantum*. É importante enfatizar que em casos de eventos imunossupressores, tais como infecção por retrovírus felino (FeLV/FIV) e imunidade celular comprometida, podem levar a visceralização do parasito (MARTÍN-SÁNCHEZ, et al., 2007).

Casos de leishmaniose felina são esporadicamente citados. Nos últimos 15 anos a soroprevalência variou em 3 a 59%, enquanto que, por métodos moleculares, como a PCR de sangue, a prevalência variou em 0,43 a 61% (PENNISI, 2010). No Brasil, DA SILVEIRA NETO, et al. (2011), revelaram a variação da prevalência em 13,3% a 23%. Recentemente, um estudo mostrou 11,1% (5/45) de gatos infectados por *Leishmania* spp. pela cPCR-SC, em região endêmica para LV no Estado de São Paulo. E em região não-endêmica para LV foram detectados 28,6% (2/7) pelo mesmo teste (OLIVEIRA, et al., 2015). Apesar dos dados apresentados apontarem os gatos como possível reservatório da LV, mais estudos de prevalência e xenodiagnóstico são necessários para melhor esclarecer o papel epidemiológico desses animais no ciclo da doença.

3.2.3 Equinos

Desde a primeira evidência de equinos infectados por *Leishmania*, descrita na Argentina, alguns autores sugerem a possibilidade de cavalos, jumentos e mulas serem hospedeiros acidentais ou até mesmo reservatórios de *Leishmania* spp., podendo exercer um papel importante na epidemiologia das leishmanioses. É

digno de nota ressaltar que a espécie de *Leishmania* descrita por Mazza (1927), na Argentina, foi a *L. braziliensis*, principal agente etiológico da LT no Brasil. Trinta e dois anos mais tarde, infecção por *L. braziliensis* foi relatada em um jumento pertencente ao Estado do Ceará, Brasil (ALENCAR, 1959). Desde então a infecção por *L. braziliensis* vem sendo descrita em equinos em vários estados do Brasil (ALENCAR, 1959; VEXENAT et al., 1986; AGUILAR et al., 1986; FALQUETO et al., 1987; YOSHIDA et al., 1988; BRANDÃO-FILHO et al., 2003; VEDOVELLO-FILHO et al., 2008; SOARES et al., 2012) e da América Latina (BONFANTE-GARRIDO et al., 1981; AGUILAR et al., 1984; RAMOS-VARA et al., 1996). E, apesar de também ser descrita em diversas espécies de animais silvestres e domésticos, nenhum animal foi identificado como o reservatório primário do parasito (CUPOLILLO et al., 2003; BRASIL, 2007). Recentemente, estudo realizado em região endêmica para LT no Sul do Brasil, os autores sugerem que os equídeos podem ser fontes de alimentos para flebotomíneos no ambiente peridoméstico e, conseqüentemente, podem desempenhar o papel de reservatórios primários no ciclo da LT causada pela espécie *L. braziliensis* (TRUPPEL, et al., 2014).

Em alguns países da Europa, casos de infecção autóctone por *L. infantum* foram descritos em equinos que apresentavam lesões cutâneas e eram pertencentes a países como Alemanha, Espanha e Portugal (KOEHLER et al., 2002; SOLANO-GALLEGO et al., 2003; ROLÃO et al., 2005).

Nas Américas, a primeira descrição de equinos infectados por *L. infantum*, ocorreu recentemente em estudo realizado por Soares e colaboradores (2013) na Capital do estado de Minas Gerais, Brasil onde a LV é considerada endêmica. Além de pioneiro na detecção do agente etiológico da LV, o estudo também foi o primeiro a revelar infecção mista de *L. infantum* e *L. braziliensis* nessa espécie de mamífero.

O estado de Minas Gerais é considerado endêmico tanto para LV como para LT. Dados do Ministério da Saúde revelam que, só no ano de 2013, foram registrados 282 casos de LV no estado, dos quais 33 evoluíram a óbito. Os casos de LT são ainda maiores, sendo registrados no mesmo período, 781 casos humanos (BRASIL, 2014b). Porém, apesar do estudo contribuir para o melhor esclarecimento do papel dos equinos na epidemiologia das leishmanioses, a doença causada pela *L. infantum* ainda permanece sem diagnóstico em equinos, principalmente em áreas endêmicas pra LV.

3.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICOS: PRINCIPAIS CONSIDERAÇÕES

O diagnóstico da LV em humanos é complexo já que essa doença pode apresentar sinais e sintomas semelhantes a outras patologias como, por exemplo, Doença de Chagas, Malária, Febre Tifoide, Esquistossomose e Tuberculose. Com relação à LVC o problema é ainda maior, pois os cães podem apresentar diferentes sinais clínicos, em graus variáveis de severidade (BANETH, et al, 2008) ou ainda, manter a doença inaparente por longos períodos, servindo de fonte de infecção para os flebotomíneos e consequentemente desempenhando papel importante na epidemiologia da LV (GONTIJO, 2004).

Por ser considerado o principal reservatório da LV no ambiente doméstico, o cão é o principal alvo das campanhas de controle da doença. O diagnóstico nesses animais é normalmente realizado por duas razões principais: Uma delas é a confirmação da doença em cães que apresentam alterações clínicas e clínico-patológicas compatíveis com a LVC e, outra razão, seria a busca ativa de cães infectados em inquéritos epidemiológicos para a triagem e eutanásia de positivos em áreas de transmissão canina e humana, conforme estabelecido pelo programa nacional de controle da LV (BRASIL, 2006).

Diferentes métodos de diagnóstico são descritos para a detecção de *Leishmania*. Os métodos sorológicos como a RIFI, ELISA e Imunocromatografia, são os mais comumente usados para a detecção de anticorpos (ALVAR, et al., 2004; MAIA; CAMPINO, 2008; MIRÓ et al., 2008). Sabe-se que a susceptibilidade à doença está relacionada com resposta imune do animal infectado, portanto, cães que apresentam altos títulos de anticorpos, geralmente apresentam um alto parasitismo e evolução da doença (REIS, et al., 2006). O intervalo para a soroconversão pode variar de 1 a 22 meses (MORENO, et al., 2002), e somente em cães em que o parasito está disseminado, os títulos de anticorpos apresentam-se elevados (PALTRINIERI, et al., 2010). Sendo assim, os métodos sorológicos aplicados a animais assintomáticos tem menor sensibilidade e podem apresentar resultados falso-negativos (STRAUSS-AYALI et al., 2004). Resultados falso-positivos também podem ser apresentados por alguns métodos sorológicos, devido à reação cruzada com outros patógenos pertencentes à família *Trypanosomatidae* (SOLLANO-GALLEGO, et al., 2011).

No Brasil, o programa de vigilância e controle da LVC utiliza duas técnicas sorológicas para o diagnóstico. A triagem é realizada por um teste imunocromatográfico fabricado como Dual-Path Platform teste rápido LVC (TR-DPP®-Leishmaniose Visceral Canina, Bio-Manguinhos, no Rio de Janeiro, Brasil). Esse kit utiliza uma proteína quimérica recombinante denominada K28, com base em fragmentos dos antígenos K9, K26 e K39 do complexo *Leishmania donovani* (GRIMALDI et al., 2012). O teste proporciona resultados qualitativos rápidos, mas, apesar de apresentar alta especificidade, a sensibilidade ainda é variável (METTLER et al., 2005). O teste utilizado para a confirmação dos animais positivos é o ELISA (BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ, 2012). Nos casos de animais positivos, a eutanásia é indicada. (COSTA, 2001; COSTA, 2008).

Paltrinieri, et al. (2010), sugerem que em cães de áreas endêmicas com sinais clínicos sugestivos de leishmaniose, a primeira abordagem diagnóstica deve ser a análise citológica dos tecidos lesados, juntamente com um método sorológico. De fato, métodos parasitológicos apresentam alta especificidade e consistem na identificação das formas amastigotas do parasita em esfregaços sanguíneos de linfonodos, aspirados de lesões cutâneas, nódulos linfáticos, medula óssea, baço e biópsias hepáticas (ALVAR, et al., 2004). Porém, a sensibilidade desse método pode variar de acordo o tipo de material colhido, grau de parasitemia e tempo de leitura da amostra (GENARO, 1993). Outra desvantagem está relacionada à coleta de amostras. Por serem invasivas, são impraticáveis nos estudos epidemiológicos em que um grande número de animais é avaliado em um curto período de tempo (COSTA, et al., 2014).

A PCR é um método para o diagnóstico da LVC, e a detecção do DNA de *Leishmania* em diversos espécimes clínicos permite um diagnóstico sensível e específico da infecção (SOLANO-GALLEGO, et. al., 2011). Diferentes sequências alvo foram desenvolvidas para o diagnóstico da doença em cães, utilizando sequências do DNA genômico ou cinetoplasto (kDNA), (GOMES, et al, 2008;. MAIA; CAMPINO, 2008; MIRÓ, et al., 2008). A sensibilidade da detecção de *Leishmania* spp. pela PCR pode variar de acordo com o tecido analisado: em medula óssea, linfonodo, baço ou pele a PCR apresenta maior sensibilidade e especificidade (MAIA, et al., 2009; MANNA, et al., 2008b; REIS, et al., 2009).

A associação entre a cPCR e o uso e a viabilidade do suabe conjuntival para a detecção de *Leishmania* spp. em cães, tem sido descrita em alguns estudos

no Brasil e Itália (FERREIRA, et al., 2008; LOMBARDO, et al., 2012), sendo relatada alta sensibilidade tanto para a detecção de animais com sintomatologia característica (STRAUSS-AYALI et al., 2004; FERREIRA et al., 2008; PEREIRA et al., 2012) quanto para animais assintomáticos (LEITE, et al., 2010; PEREIRA, et al., 2012; BENVENGA, 2013). O estudo de Pereira, et al., (2012), também comprovou a eficácia do suabe conjuntival em inquérito epidemiológico, demonstrando ser um método pouco invasivo, prático e que não requer mão-de-obra especializada. Benvenga, (2013), também demonstrou eficácia da técnica, a qual foi capaz de detectar gatos e equinos infectados pelo parasito.

Embora a cPCR ter demonstrado ser eficaz na detecção de *Leishmania* spp., esse método ainda se limita na simples detecção do DNA (DA SILVA, 2010) enquanto que a qPCR realiza a quantificação dos ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

As sondas fluorescentes do tipo *TaqMan*® são, geralmente, as utilizadas para o monitoramento dos produtos de amplificação, detectando sequências específicas nos fragmentos de DNA alvo (MAIA e CAMPINO, 2008). Essas sondas apresentam em uma extremidade um fluoróforo e na outra um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Os produtos da hibridização são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease da *Taq* DNA polimerase, ou seja, durante o processo de amplificação a sonda *TaqMan*® hibridiza com a sequência da fita simples de DNA complementar alvo sendo degradada após a atividade exonuclease da *Taq* polimerase separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão resultando num aumento da fluorescência. A emissão de fluorescência gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto de PCR. A aquisição de dados e análise da reação é realizada através de um computador e *software* específico.

A reação com sondas *TaqMan*® utilizando como alvo o kDNA na detecção de *Leishmania* spp. tem revelado sensibilidade de 0,001 parasitas por reação de PCR (FRANCINO, et al., 2006), sendo esse resultado foi semelhante ao resultado obtido por Mary, et al. (2004) na qual a sensibilidade do método foi de 0,0125 parasitas/mL de sangue. Além disso, a utilização da sonda fornecer maior especificidade ao ensaio (RANASINGHE, et al., 2008).

Tendo em vista a complexidade do diagnóstico da LVC, entender a base de cada método, suas limitações e sua interpretação é essencial para facilitar a escolha da técnica adequada. A associação entre a PCR e métodos de obtenção de amostras menos invasivos, como o suabe conjuntival, tem demonstrado ser eficaz na detecção de *Leishmania* spp. Com a qPCR a praticidade da coleta será aliada à praticidade e especificidade desse teste molecular. Além disso, é possível a análise quantitativa das amostras e também a análise de um número grande de amostras por vez obtendo-se assim, um diagnóstico mais preciso e sensível, aplicável a coletas em grande escala, em diferentes espécies de mamíferos.

4 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi detectar *Leishmania* spp. pela qPCR e *L. infantum* pela cPCR em amostras de DNA extraído de sangue e suabe conjuntival de cães, gatos e equinos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAGEM

Foram avaliadas amostras de sangue e suabe conjuntival de 204 cães, 108 gatos e 54 equinos, coletadas durante o estudo de Benvenga (2013) de Clínicas Veterinárias, Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) e Canil Municipal de áreas endêmicas e não endêmicas para LV. Os animais foram avaliados clinicamente para verificar a presença de sinais clínicos compatíveis com a leishmaniose e classificados conforme as formas clínicas descritas por Manciante, et al., (1988) para cães.

5.2 REGIÕES DE ESTUDO

5.2.1 Bragança Paulista

Município do Estado de São Paulo, localizado a uma latitude 22°57'07" Sul, longitude 46°32'31" Oeste, altitude de 817 metros, distante 88 km da capital Paulista. Sua população estimada em 2014 era de 158.856 habitantes (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE). Amostras de sangue e suabe conjuntival foram coletadas em 14 equinos pertencentes a esse município.

5.2.2 Embu das Artes

Município da microrregião de Itapeverica da Serra, na Região Metropolitana de São Paulo, localizado a uma latitude 23° 38' 56" Sul, longitude 46° 51' 08" Oeste, altitude de 775 metros e a 30,6 km de São Paulo/SP. Dados do IBGE apontam população estimada em 2014 de 259.053 habitantes. Amostras de sangue e suabe conjuntival foram coletadas em 45 cães e 9 gatos pertencentes a esse município.

5.2.3 Ilha Solteira

Município pertencente à mesorregião de Araçatuba, localizando-se a uma latitude 20°25'58" Sul e a uma longitude 51°20'33" Oeste, estando a uma altitude de

aproximadamente 335 metros, 673 km distante de São Paulo/SP. Sua população estimada em 2014 era de 26.242 habitantes (IBGE, 2014). Amostras de sangue e suabe conjuntival foram coletadas em 40 equinos pertencentes a esse município.

5.2.4 Itapecerica da Serra

Município localizado a 36,7 km de São Paulo/SP, na região metropolitana de São Paulo, com latitude de 23° 43' 01", longitude de 46° 50' 57" e uma altitude de 906 metros. Segundo o IBGE a população estimada em 2014 era de 165.327 habitantes. Amostras de sangue e suabe conjuntival foram coletadas em 32 cães e 13 gatos pertencentes a esse município.

5.2.5 Pirassununga

Município do estado de São Paulo, localizado a 212 km da Capital Paulista, na região Centro-Leste do estado a uma latitude 21°59'46" Sul, longitude 47°25'33" Oeste com altitude de 627 metros. Sua população estimada em 2014 era de 74.128 habitantes, conforme IBGE (2014). Amostras de sangue e suabe conjuntival foram coletadas em 7 gatos pertencentes a esse município.

5.2.6 São Lourenço da Serra

Município da microrregião de Itapecerica da Serra, na Região Metropolitana de São Paulo, localizado a uma latitude 23° 51' 09" Sul, longitude 46° 56' 33" Oeste e altitude de 690 metros, distante 54,8 km de São Paulo/SP. Dados do IBGE apontam população estimada em 2014 de 15.028 habitantes. Amostras de sangue e suabe conjuntival foram coletadas em 10 cães e 3 gatos pertencentes a esse município.

5.2.7 São Paulo

Município capital do estado de São Paulo, localizado a uma latitude 23° 32' 51", longitude 46° 38' 10", e altitude de 760 metros. Dados do IBGE apontam população estimada em 2014 de 11.895.893 habitantes. Amostras de sangue e

suabe conjuntival foram coletadas em 117 cães e 76 gatos pertencentes a esse município.

5.3 ASPÉCTOS ÉTICOS

O projeto “Comparação da eficácia da PCR em tempo real sobre a PCR convencional na detecção de *Leishmania* spp. em amostras de suabe conjuntival de gatos e equinos”, teve seu conteúdo apresentado e aprovado junto ao Comitê de Ética da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo sob o número 13.1.2341.74.8. A adição das amostras de cães ao estudo exigiu uma nova submissão ao referido Comitê sendo aprovado com o mesmo número.

5.4 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

A coleta de sangue foi realizada diretamente da veia cefálica ou veia jugular externa. Aproximadamente 3 a 5mL de sangue foram colhidos por animal. O sangue coletado foi armazenado em tubos com anticoagulante para preservação do sangue a -20°C até o momento da extração de DNA, para realização de exames moleculares.

As amostras de células epiteliais da conjuntiva ocular foram coletadas de cada animal, nos dois olhos, utilizando suabes estéreis produzidos para o isolamento bacteriológico. Na conjuntiva inferior de ambos os olhos de cada animal, esfregou-se o suabe estéril para a coleta de células esfoliativas. Os suabes foram acondicionados em microtubos de 1,5mL livres de DNase e RNase armazenadas a 4°C até o momento da extração de DNA, para realização de exames moleculares.

5.5 EXTRAÇÃO DE DNA DE SUABE CONJUNTIVAL E SANGUE

A extração de DNA das amostras de suabe conjuntival de cães, gatos e equinos e sangue de cães e gatos foi a técnica de *salting-out* descrita por John et. al (1991) e modificada por Lahiri; Nurnberger (1991). Para a extração de sangue de equinos foi utilizado Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit, Healthcare®, conforme recomendações do fabricante.

5.6 PCR CONVENCIONAL (cPCR)

5.6.1 Curva padrão para definição do limiar de detecção do DNA de *Leishmania* spp. e *L. infantum*

Como controle positivo das reações de PCR, uma amostra padrão de DNA de *L. infantum* MCAN/BR/1984/CCC-17.481, cedida pelo Laboratório de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Para a avaliação do limite de detecção foi realizada uma curva padrão (fator de diluição 10) com quantidades conhecidas de DNA genômico de *L. infantum*, que variou de 32,8ng à 0,0032fg (fentogramas).

As reações para a detecção da curva padrão foram as mesmas utilizadas para a detecção do parasito nas amostras, descritas nos itens 5.6.2 e 5.6.3.

5.6.2 spp.cPCR para detecção do DNA de *Leishmania* spp.

A detecção de *Leishmania* spp., feita por Benvenga (2013), foi realizada conforme descrito a seguir: A mistura para a reação foi preparada do seguinte modo: 2,5µL de tampão (200mM Tris-HCl; 500mM KCl, pH 8,4), 0,75µL de MgCl₂ (1,5mM), 0,5µL de dNTP's (10mM cada), 1,5µL de cada *primer* (10pmol/µL), 0,15µL de *Platinum*® Taq DNA Polimerase (Invitrogen®) (5U/µL), quantidade suficiente de água Milli-Q para completar 22,5µL e 2,5µL de DNA (10ng/µL), totalizando um volume final de 25µL. As reações de amplificação serão conduzidas em termociclador com ciclos de: Desnaturação Inicial: 94°C (3 min.); e 35 ciclos: D: 94°C (40 seg.); A: 56°C (30 seg.); E: 72°C (30 seg.); E final: 72°C (5 min.). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção de *Leishmania* spp. foram o 13A: (5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3'), 13B: (5' -ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3'), descritos por Rodgers et al. (1990). Como controle negativo água deionizada estéril. O produto final amplificado da reação positiva era de 120pb.

5.6.3 inf.cPCR para a detecção do DNA de *L. infantum*

A mistura para a reação foi preparada do seguinte modo: 2,5µL de tampão (200mM Tris-HCl; 500mM KCl, pH 8,4), 0,75µL de MgCl₂ (1,5mM), 0,5µL de dNTP's (10mM cada), 1,5µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 0,15µL de *Platinum*® Taq DNA

Polimerase (Invitrogen®) (5U/μL), quantidade suficiente de água Milli-Q para completar 22,5μL e 2,5μL de DNA (10ng/μL), totalizando um volume final de 25μL. As reações de amplificação serão conduzidas em termociclador com ciclos de: Desnaturação Inicial: 94°C (2 min.); e 40 ciclos: D: 94°C (20 seg.); A: 60°C (20 seg.); E: 72°C (30 seg.); E final: 72°C (5 min.). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção de *Leishmania* do Complexo *L. (L.) donovani* foram MC1: (5' – GTT AGC CGA TGG TGG TCT TG – 3'); MC2: (5' – CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG – 3'), descritos por Cortes et al. (2004). Como controle negativo água deionizada estéril. O produto final amplificado da reação positiva era de 447pb.

5.7 ELETROFORESE

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

5.8 PCR em tempo real (qPCR)

5.8.1 Validação da qPCR

A qPCR foi validada utilizando a curva padrão citada no item 5.5.1. Para garantir a repetibilidade do sistema, as análises, descritas no item 5.6.2, foram realizadas em triplicata, sendo, o mesmo experimento repetido três vezes em dias diferentes. Para otimizar a quantidade de DNA extraído, uma segunda curva padrão foi realizada. Esta curva seguiu o mesmo protocolo de diluição e execução, entretanto, ao invés de 5μL de amostra de DNA, foi utilizado 1μL de amostra. O ciclo de corte do ensaio foi definido baseado no cálculo: média da triplicata da última diluição detectada na curva padrão +3*DP (desvio padrão).

5.8.2 Reação da qPCR

A reação de qPCR, tanto para a definição do limiar de detecção, quanto para a detecção do DNA de *Leishmania* spp. nas amostras de sangue (qPCR-SG) e

suabe conjuntival (qPCR-SC) das diferentes espécies avaliadas, foi realizada conforme descrito por Francino, et al. (2006): foi utilizada a sonda *TaqMan*® (FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-BHQ-1) para a detecção de um segmento conservado do minicírculo do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp., juntamente com os *oligonucleotídeos* LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3'), que são pequenas modificações dos *oligonucleotídeos* 13A e 13B para a adaptação dos ensaios com a sonda *TaqMan*®. Para a reação de qPCR foi utilizado o kit LightCycler® 480 Probes Master (Roche®, Life Science, Brasil) em volume 20µL sendo 10µL de 2x concentrado PCR Mix contendo *FastStart Taq DNA Polymerase*, tampão de reação, dNTP mix e 6,4nM MgCl₂, 1,8µL de cada oligonucleotídeo (900nM de cada oligonucleotídeo), 0,4µL de sonda (200nM) e 1µL de amostra foram utilizados. As reações de amplificação foram conduzidas no termociclador LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) com ciclos de: 95°C (10 min.); 50 ciclos a 95°C por 15 seg., 50°C por 1 min. e 72°C (1 seg.). Os produtos da qPCR foram analisados com o programa específico do equipamento e a eficiência de cada reação foi determinada baseada na curva padrão. Os valores foram expressos em Cycle Threshold (Ct), ou seja, o valor que a amostra atinge a linha Threshold determinada após o cálculo da eficiência de cada reação.

5.9 SEQUENCIAMENTO

Os resultados positivos para *L. infantum* foram enviados ao Serviço de Sequenciamento de DNA do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco - IB – USP para sequenciamento. Seis produtos amplificados pela cPCR, específica para *Leishmanias* do Complexo *L. (L.) donovani*, foram submetidos ao sequenciamento. Cada reação com um oligonucleotídeo específico (sentido senso ou anti-senso) foi realizada em triplicada para garantir confiabilidade nas sequências geradas. O fragmento de DNA foi purificado através da eletroforese em gel agarose 1,5% (m/v) contendo SYBR safe (Invitrogen®). A banda específica foi extraída do gel com auxílio de uma lâmina de bisturi, assim o produto de PCR foi purificado utilizando o kit de purificação Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GEHealthcare®) e as amostras quantificadas utilizando um espectrofotômetro. O programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) foi utilizado para

analisar as sequências de nucleotídeos (BLASTN), objetivando-se procurar e comparar genes similares, em banco de dados internacionais (GenBank), com a sequência obtida.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O grau de concordância entre os dois testes (cPCR e qPCR) foi determinado através do indicador *Kappa* (κ) descrito por Landis; Koch (1977). Valores de $\kappa < 0$, sem concordância; κ entre 0 – 0,20 concordância leve; κ entre 0,21 – 0,40 concordância baixa; κ entre 0,41 – 0,60 concordância moderada; κ entre 0,61 – 0,80 concordância alta; e κ entre 0,81 – 0,99 representa concordância excelente.

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE CLÍNICA DOS ANIMAIS

No momento da coleta, todos os animais foram clinicamente avaliados e classificados como assintomáticos, de acordo com a classificação proposta por Mancianti, et al., (1988) para cães.

6.2 spp.cPCR PARA DETECÇÃO DO DNA DE *Leishmania* spp.

6.2.1 Definição do limiar de detecção da spp.cPCR

O limite de detecção da spp.cPCR com os oligonucleotídeos descritos por Rodgers et al. (1990) foi de 0,0328fg.

6.2.2 spp.cPCR para a detecção do DNA de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos

No estudo de Benvenga, (2013), 3,92% (8/204) de cães pertencentes à cidade de São Paulo foram detectados positivos para *Leishmania* spp. pela spp.cPCR-SG. A detecção desse parasito pela spp.cPCR-SC revelou 1,71% (2/117) de cães positivos no município de São Paulo, 3,12% (1/32) de cães positivos no município de Itapeverica da Serra e 10% (1/10) de cães positivos no município de São Lourenço.

Com relação aos gatos, todos os animais pertencentes aos municípios avaliados foram negativos na spp.cPCR-SG. No entanto, 1,85% (2/108) gatos do município de Pirassununga foram positivos na spp.cPCR-SC.

Dos 54 equinos avaliados, todos foram positivos para *Leishmania* spp. na spp.cPCR-SG. Quando avaliados pela spp.cPCR-SC, 66,66% (36/54) dos equinos foram positivos. Quatorze animais pertencentes ao município de Bragança Paulista e 40 equinos pertencentes ao município de Ilha Solteira.

6.2.3 Definição do limiar de detecção da inf.cPCR

Usando a mesma curva citada acima, foi avaliado o limiar de detecção com os oligonucleotídeos descritos por Cortes et al. (2004), sendo revelado o mesmo limite de detecção, de 0,328fg (Figura 1).

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos MC1 e MC2, obtidos pela PCR de diluições seriadas (fator 10) com DNA de *L. infantum*, gerando fragmentos de 447bp. Linha 1 (L1): Padrão 100bp; L2: Controle positivo (*L. infantum*); L3: Controle negativo; L4 a L17: curva padrão, diluições seriadas variando a concentração das amostras de 32,8ng à 0,0032fg, sendo 0,328 a última diluição detectável. – Pirassununga – 2015.

Fonte: BENASSI, J.C. (2015)

6.2.4 inf.cPCR para a detecção do DNA de *L. infantum* em cães, gatos e equinos

Foram negativas todas as amostras de cães, gatos e equinos avaliadas pela inf.cPCR-SC, utilizando os oligonucleotídeos MC1 e MC2. Pela inf.cPCR-SG cães e gatos apresentaram resultados negativos. No entanto, amostras de equinos avaliadas pela inf.cPCR-SG, revelaram 11,11% (6/54) de equinos positivos para *L. infantum*. (Figura 2).

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos MC1 e MC2, obtidos pela inf.cPCR-SG de equinos, gerando fragmentos de 447bp. Linha 1 (L1): Padrão 100bp; L2: Controle positivo (*L. infantum*); L3: Controle negativo; L4 a L9: amostras de sangue de equinos positivos na inf.cPCR-SG utilizando oligonucleotídeos MC1 e MC2 para a detecção de Leishmanias do Complexo *L. (L.) donovani* – Pirassununga – 2015.

Fonte: BENASSI, J.C. (2015)

6.3 qPCR PARA DETECÇÃO DE *Leishmania* spp.

6.3.1 Validação da qPCR

Como o DNA de uma *Leishmania* spp. tem aproximadamente 50fg (NOYES et al. 1998), e a última concentração detectável foi de 0,0328fg a capacidade de detecção do teste foi de $\approx 0,001$ parasita por amostra, o que corresponde a 10 cópias de DNA, uma vez que o kDNA de uma *Leishmania* possui cerca de 10.000 minicírculos de DNA (MOHAMMADIHA, et al., 2013) . A eficiência da curva foi de 104%, e a inclinação da curva (slope) obtida foi de -3,22 e o ponto de intersecção no eixo Y de 34,17 (Figura 3).

A figura 4 ilustra a eficiência de 106% da segunda curva validada, a inclinação da curva (slope) foi de -3,17, a intersecção no eixo Y foi de 34,11, e o R2 foi de 0,99. O ciclo de corte do ensaio foi definido baseado no cálculo: média da triplicata da última diluição detectada na curva padrão +3*DP (desvio padrão). O teste é válido

unicamente se a fluorescência do controle negativo (mix + água sem amostra) for negativo e o controle positivo apresentar um sinal não contestável ($C_t < 38,59$) (Figura 4). Sendo esta a curva padrão externa utilizada para análise das amostras.

Figura 3 – Curva padrão com diluições seriadas de 5µL de DNA de *L. infantum* MCAN/BR/1984/CCC-17.481, cedida pelo Laboratório de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Realizada pelo aparelho LightCycler 480II

da Roche. Pirassununga - 2015

Fonte: BENASSI, J.C. (2015)

Figura 4 – Curva padrão com diluições seriadas de 1µL de DNA de *L. infantum* MCAN/BR/1984/CCC-17.481, cedida pelo Laboratório de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Realizada pelo aparelho LightCycler 480II da Roche. Pirassununga – 2015

Fonte: BENASSI, J.C. (2015)

6.3.2 Resultados da qPCR em cães

Dos 204 cães avaliados, todos foram negativos na qPCR-SG. No entanto, a qPCR-SC revelou 0,85% (1/117) cão positivo no município de São Paulo e 2,22% (1/45) cão positivo no município de Embu das Artes.

Os resultados apresentados pela qPCR-SG não apresentam concordância com os resultados obtidos pela spp.cPCR-SG uma vez que por esse método 3,92% (8/204) dos cães foram detectados positivos para *Leishmania* spp. A positividade por município obtida pela qPCR-SC, quando comparada aos resultados da spp.cPCR-SC, revela um índice de concordância moderada ($kappa=0,49$), isso porque um cão pertencente ao município de São Paulo foi positivo em ambos os métodos avaliados. Quando a positividade por animal é comparada, observa-se uma concordância baixa entre a qPCR e spp.cPCR, com valor de $kappa$ igual a 0,32 (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação entre os testes spp.cPCR-SC e qPCR-SC de cães positivos pertencentes aos diferentes municípios do Estado de São Paulo.

	Espécie	Cidade	spp.cPCR-SC ^a n ^b	qPCR-SC ^c n	Concordância ^d
Positividade/ cidade	Cão	São Paulo	2/117	1/117	0,49
		Embu das Artes	0/45	1/45	-
		Itapecerica da Serra	1/32	0/32	-
			1/10		
		São Lourenço		0/10	-
Positividade /animal			4/204	2/204	0,32

(^a)PCR convencional de amostras de suabe conjuntival de cães avaliadas no estudo de Benvenga, (2013). (^b) Cães positivos/total de cães. (^c) PCR quantitativa das mesmas amostras de suabe conjuntival de cães avaliadas por Benvenga, (2013). (^d) Concordância de acordo com análise do índice $Kappa$ ajustado. Fonte: BENASSI, J.C. (2015)

6.3.3 Resultados da qPCR em gatos

Foram avaliados 108 gatos, todos foram negativos na qPCR-SG. No entanto, 1,85% (2/108) dos gatos foram positivos na qPCR-SC, os animais pertenciam ao município de Pirassununga

O resultado obtido pela qPCR-SC corroborou com o resultado obtido pela spp.cPCR-SC, no qual os mesmos animais foram positivos revelando uma excelente concordância entre os métodos, com valor de $k = 1$ (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação entre os testes spp.cPCR-SC e qPCR-SC de gatos positivos pertencentes ao município de Pirassununga do Estado de São Paulo.

Espécie	spp.cPCR-SC^a n^b	qPCR-SC^c n	Concordância^b
Gato	2/108	2/108	1,00

(^a) PCR convencional de amostras de suabe conjuntival de gatos avaliadas no estudo de Benvenga, (2013). (^b) Gatos positivos/total de gatos. (^c) PCR quantitativa das mesmas amostras de suabe conjuntival de gatos avaliadas por Benvenga, (2013). (^d) Concordância de acordo com análise do índice *Kappa* ajustado. Fonte: BENASSI, J.C. (2015)

6.3.4 Resultados da qPCR em equinos

Foram avaliados 54 equinos, sendo 14 equinos pertencentes ao município de Bragança Paulista e 40 pertencentes ao município de Ilha Solteira e todos foram negativos na qPCR-SG. Quando realizada a qPCR-SC em amostras de equinos pertencentes a Bragança Paulista, os resultados revelaram 42,86% (6/14) de equinos positivos para *Leishmania* spp. Já no município de Ilha Solteira, a qPCR-SC revelou 2,5% (1/40) de equino positivo na detecção do parasito.

Os resultados apresentados pela qPCR-SG não apresentam concordância com os resultados obtidos pela spp.cPCR-SG, uma vez que por esse último, 100% (54/54) dos equinos foram detectados positivos para *Leishmania* spp. Também não se observa concordância entre os resultados obtidos pela qPCR-SC comparados aos resultados obtidos pela spp.cPCR-SC, a qual detectou 90% (36/40) de equinos pertencentes a Ilha Solteira, positivos na detecção de *Leishmania* spp. (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação entre os testes spp.cPCR e qPCR em amostras de sangue e suabe conjuntival de equinos pertencentes aos município de Bragança Paulista e Ilha Solteira no interior do Estado de São Paulo

	Cidade	spp.cPCR-SG ^a n ^b	qPCR-SG ^c n	spp.cPCR-SC ^d n	qPCR-SC ^e n
Positividade/ cidade	Bragança Paulista	14/14	0/14	0/14	6/14
	Ilha Solteira	40/40	0/40	36/40	1/40
Positividade/ Equino		54/54	0/54	36/54	7/54

(^a) PCR convencional de amostras de sangue de equinos avaliados no estudo de Benvenga, (2013). (^b) Equinos positivos/total de Equinos. (^c) PCR quantitativa das mesmas amostras de sangue de equinos avaliados por Benvenga, (2013). (^d) PCR convencional de amostras de suabe conjuntival de equinos avaliados no estudo de Benvenga, (2013). (^e) PCR quantitativa de amostras de suabe conjuntival de equinos avaliados no estudo de Benvenga, (2013). Fonte: BENASSI, J.C. (2015)

6.4 SEQUENCIAMENTO

Dos seis fragmentos enviados para o sequenciamento, dois compartilharam similaridade próxima a 100% com sequências de *L. infantum* (GenBank: KF695386.1); (GenBank: JQ609538.1) (Figura 5).

Figura 5 - Relatório gráfico da versão web de BLAST mostrando similaridade de 98% com *L. chagasi* e *L. infantum* de um do fragmento sequenciado

7 DISCUSSÃO

Apesar dos animais desse estudo não apresentarem sinais clínicos compatíveis com as leishmanioses no período da coleta de amostras clínicas, foram encontrados cães, gatos e equinos positivos, em ao menos um dos testes utilizados.

Apenas Ilha Solteira é região endêmica para LV, sendo registrado, no período de 2007 a 2015, um caso de LV humana autóctone. Nos demais municípios avaliados, apesar de não endêmicos para LV, casos de LT humana autóctones são relatados. Só no período de 2007 a 2015, foram confirmados 2 casos no município de Bragança Paulista, 5 casos em Itapeceira da Serra, 9 casos em Pirassununga, 3 casos em São Lourenço da Serra e 238 casos em São Paulo. No município de Embu das Artes, o último relato de LT foi em Abril de 2008, sendo 3 casos confirmados (SÃO PAULO, 2015).

A qPCR-SG não detectou cães positivos em nenhum dos municípios avaliados. Esses resultados foram divergentes dos resultados obtidos pela spp.cPCR-SG, em que 3,92% (8/204) dos cães pertencentes ao município de São Paulo foram detectados positivos para *Leishmania* spp. Já a qPCR-SC detectou 0,85% (1/117) de cães positivos em São Paulo e 2,22% (1/45) em Embu das Artes. Os resultados obtidos pela qPCR-SC de cães pertencentes ao município de São Paulo apresentaram concordância baixa com os resultados obtidos na spp.cPCR-SC, uma vez que um cão foi positivo em ambos os métodos avaliados. Apesar dessa concordância observada, a spp.cPCR-SC detectou maior número de cães positivos, 1,96% (4/204), que a qPCR-SC, 0,98% (2/204), para *Leishmania* spp.

Da mesma forma que nos cães, os resultados em equinos foram bastante divergentes entre a cPCR e qPCR. Enquanto na spp.cPCR-SG 100% (54/54) equinos foram positivos na detecção de *Leishmania* spp., nenhum animal foi positivo na qPCR-SG. Em relação as amostras de suabe conjuntival, na spp.cPCR-SC, 66,66% (36/54) dos equinos avaliados foram positivos enquanto que na qPCR-SC, 2,5% (1/40) de equinos pertencentes a Ilha Solteira e 42,86% (6/14) dos equinos pertencentes a Bragança Paulista, foram positivos para *Leishmania* spp.

Os métodos moleculares baseados em PCR vêm sendo amplamente empregados na detecção de *Leishmania* spp., por promoverem alta sensibilidade e especificidade em comparação aos métodos parasitológicos (KUMAR, et al., 2007).

Os ensaios de cPCR, geralmente utilizam como alvo, sequências de DNA genômico ou de cinetoplásto (kDNA). O kDNA é considerado o alvo mais sensível na detecção de *Leishmanias*, pois apresenta cerca de 10.000 minicírculos de DNA distribuídos em, aproximadamente, 200bp de região conservada e 600bp de região variável (MOHAMMADIHA, et al., 2013).

Embora a cPCR baseada na detecção do kDNA tenha demonstrado alta sensibilidade (STRAUSS-AYALI, et al., 2004), a técnica ainda se limita na simples detecção do DNA enquanto a qPCR permite também a detecção da carga parasitária a partir da quantidade de DNA do parasito presente nas amostras avaliadas (BOSSOLASCO, et al., 2003; SCHULZ, et al., 2003; CRUZ, et al., 2006; TUPPERWAR, et al., 2008) e, dessa forma, monitorar a progressão de infecção de uma forma mais precisa (FRANCINO, et al., 2006). Ainda, o uso da qPCR na detecção de *Leishmania* spp., utilizando sondas *TaqMan*® e oligonucleotídeos que tem como alvo o kDNA, correspondem a uma maximização da sensibilidade, sendo descrita uma sensibilidade de detecção da ordem de 0,001 parasitos por reação (FRANCINO, et al., 2006), além disso, a amplificação com base na hibridização de uma sonda *TaqMan*® fornece maior especificidade ao ensaio (RANASINGHE, et al., 2008).

Apesar de serem vários os relatos que tendem a generalizar a ideia de que a qPCR é mais sensível que a cPCR (MARY, et al., 2004; FRANCINO, et al., 2006; MANNA, et al., 2008a,b), no presente estudo, foi observado um limiar de detecção idêntico entre cPCR e qPCR com oligonucleotídeos tendo o kDNA como alvo, da ordem de 0,0328fg de parasitos por reação e, ainda, tanto a spp.cPCR-SG quanto a spp.cPCR-SC, detectaram um maior número de cães e equinos positivos do que a qPCR com os dois tipos de espécimes clínicos avaliados.

É inegável que a qPCR tem melhorado e representa um progresso nas práticas de diagnóstico molecular (BASTIEN, et al., 2008). A rapidez na obtenção de resultados, redução da contaminação pós-PCR, bem como a quantificação do DNA alvo, são as principais vantagens da qPCR sobre a cPCR. (LACHAUD, 2002; FRANCINO et al, 2006) Mas, assim como a cPCR, a qPCR é uma técnica que engloba uma série de técnicas e os resultados podem sofrer influências de diversos fatores.

No trabalho de Bastien e colaboradores (2008), as condições da reação como a temperatura de hibridização, concentrações de MgCl₂ e a concentração da enzima

Taq DNA polimerase, são citados como fatores que podem influenciar na diferença de sensibilidade entre a cPCR e qPCR. De fato, as condições das reações nos dois métodos avaliados nesse estudo, foram diferentes. Nos itens 5.6.2 e 5.8.2, se observam diferenças de fabricantes nas preparações comerciais de *Taq DNA polimerase*, além da diferença em todo o ciclo de amplificação, sendo sugerido que essas diferenças possam ter influenciado na diferença de sensibilidade entre as PCRs. Além disso, o número de cópias do DNA alvo, presentes no genoma do parasito, também é um fator bastante influenciável na sensibilidade. Ainda que ambos os métodos de PCR empreguem o mesmo alvo e, até mesmo, oligonucleotídeos semelhantes, não necessariamente se obtêm resultados idênticos (BASTIEN, et al., 2008).

Apesar das divergências entre os métodos, spp.cPCR-SC e qPCR-SC, observada em cães e equinos, a detecção do DNA por meio da qPCR-SC, parece ser mais sensível que a qPCR-SG. Vale lembrar que, cães, gatos e equinos não foram detectados positivos para *Leishmania* spp. pela qPCR-SG enquanto 0,98% (2/204) dos cães, 1,85% (2/108) dos gatos e 12,96% (7/54) dos equinos foram positivos na qPCR-SC.

A eficácia do suabe conjuntival para a detecção desse parasito pela spp.cPCR, em cães, já foi comprovada por Pereira, et al. (2012) demonstrando ser um método pouco invasivo, prático, não requerendo mão-de-obra especializada, além de revelar alta sensibilidade na detecção de cães sintomáticos (STRAUSS-AYALI et al., 2004; FERREIRA et al., 2008; PEREIRA et al., 2012) e assintomáticos (LEITE, et al., 2010; PEREIRA, et al., 2012). O presente estudo também corrobora com Solano-Gallego, et al., (2011), no qual afirma que a detecção de *Leishmania* spp. pela qPCR em amostras de suabe conjuntival de cães, é mais sensível que a técnica aplicada em amostras de sangue.

O uso de suabe conjuntival em equinos já teve sua eficácia comprovada no diagnóstico de micro-organismos que possuem tropismo pela conjuntiva ocular (SAMUELSON; ANDRESEN; GWIN, 1984; PISANI, et al., 1997; BORCHERS, et al., 2006). Para a detecção de *Leishmania* spp. nessa espécie, o estudo de Benvenga (2013) foi o primeiro a relatar a eficácia do suabe conjuntival, detectando 66,66% (36/54) de equinos positivos pela spp.cPCR-SC.

Em relação aos gatos, o uso do suabe conjuntival também tem demonstrado ser uma ferramenta que pode facilitar estudos epidemiológicos. Em estudo realizado

por Oliveira, et al. (2015), foi obtido pela spp.cPCR-SC a detecção de 28,6% (2/7) e 11,1% (5/45) gatos pertencentes a Pirassununga e Ilha Solteira, respectivamente, positivos para *Leishmania* spp.

No presente estudo, os resultados obtidos na spp.cPCR-SC e qPCR-SC apresentaram excelente concordância, uma vez que dois mesmos animais pertencentes a Pirassununga foram detectados positivos para *Leishmania* spp. tanto pela spp.cPCR-SC quanto para qPCR-SC. Ainda, o sucesso da spp.cPCR-SC e qPCR-SC comparado a qPCR-SG na detecção desse parasito em gatos, corrobora com os resultados obtidos pelo estudo de Marques e colaboradores (2013), no qual se obteve maior detecção de gatos positivos na qPCR-SC (23%) que na qPCR-SG (5%).

O limiar de detecção também foi avaliado utilizando como alvo região do kDNA específica de leishmanias do Complexo *Donovani* e, nesse caso, foi observado que a qPCR foi dez vezes mais sensível que a inf.cPCR. Apesar disso, a inf.cPCR-SG, utilizando esse alvo, revelou no presente estudo, 11,11% (6/54) de equinos pertencentes ao município de Ilha Solteira, positivos. As amostras desses animais, submetidas ao sequenciamento resultaram em similaridade de 99% com *L. infantum*.

As divergências observadas acima podem estar relacionadas ao fato de que, a curva padrão utilizada para a detecção do limiar, tanto da cPCR específica para *L. infantum* quanto qPCR, foi obtida do DNA de *L. infantum* proveniente de cultura axênica, enquanto o DNA dessas amostras positivas, foi obtido da extração de sangue de equino que podem conter vestígios de substâncias inibitórias influenciando na detecção da *Leishmania* spp. pela qPCR-SG. Além disso, tendo em vista que a amplificação do DNA utilizando a hibridização de sondas *TaqMan*®, confere mais especificidade ao ensaios (RANASINGHE, et al., 2008), qualquer variabilidade genética no DNA alvo pode ocasionar a incompatibilidade no reconhecimento da sonda resultando na dificuldade de amplificação e, consequentemente, redução na sensibilidade analítica (BASTIEN, et al., 2008).

Enquanto a infecção por *L. infantum* é bem conhecida em humanos e cães, outros animais domésticos recebem menos atenção (QUINNELL; COURTENAY, 2009). O papel dos equinos na epidemiologia da LV e a patogenia desse parasito em equinos ainda são desconhecidas. A preferência alimentar dos *Lu. Longipalpis* é determinada pela acessibilidade, abundância, tamanho e biomassa do hospedeiro

(QUINNELL; DYE; SHAW, 1992; BERN; COURTENAY; ALVAR, 2010; MARCONDES; ROSSI, 2013). Afonso, et al. (2012), observaram que os flebotomíneos se alimentavam preferencialmente por sangue de aves e que a preferência por cães, estava em segundo lugar seguido dos equinos, gambás, ovelhas, cabras, roedores e homem. A diversificação alimentar, por parte dos flebotomíneos aliada à rápida adaptação do vetor ao ambiente doméstico propicia a busca por novas fontes de alimentação, com isso, sugere-se que em algumas regiões, o papel do cão na epidemiologia da doença causada pela *L. infantum*, pode ser pouco considerável (FELIPE, et al., 2011; AFONSO, et al., 2012).

A primeira evidência da infecção por *L. infantum* em equinos no Brasil é recente (SOARES et. al., 2013), e vale ressaltar que este é o primeiro estudo a confirmar a presença de *L. infantum* em equinos por sequenciamento de amostras positivas.

O cenário da LV é complexo no Brasil, isso porque se trata de uma doença de alta transmissão em áreas onde existem condições favoráveis à manutenção da doença. Em grandes centros urbanos, vários são os fatores que podem contribuir para a elevada expansão da doença. Dentre eles o crescimento da população nas periferias, em condições socioeconômicas precárias, ausência de estrutura sanitária, aglomeração populacional, presença e reprodução descontrolada de animais domésticos juntamente com a presença de potenciais criadouros de flebotomíneos em quintais e adaptação desse vetor aos ambientes modificados pelo homem. Além disso, a LV ainda é uma doença negligenciada em muitos municípios, o que resulta em redução nos investimentos em saúde e educação e, conseqüentemente, falhas nas ações de controle (MARCONDES; ROSSI, 2013).

A associação entre a qPCR e o uso de um método prático, fácil e não invasivo, como o suabe conjuntival, representa um grande avanço no diagnóstico da doença em cães, gatos e equinos uma vez que a qPCR-SC foi capaz de detectar um maior número de animais infectados pela *Leishmania* spp. em relação a qPCR-SG. Além disso, a detecção da *Leishmania* spp. nas diferentes espécies avaliadas e a confirmação de *L. infantum* em equinos, associado à inexistência de sinais clínicos nestes animais, reforça a atuação do cão como reservatório da LV urbana e revela a possibilidade de gatos e equinos serem reservatórios deste parasito. Conseqüentemente, estudos adicionais devem ser realizados, para melhor elucidar o papel dos felinos e equídeos na epidemiologia das leishmanioses.

8 CONCLUSÕES

Observa-se, no presente estudo que a qPCR-SC foi melhor que a qPCR-SG na detecção de cães, gatos e equinos infectados pela *Leishmania* spp. No entanto, a qPCR-SC detectou o mesmo número ou menor número de animais infectados quando comparada com a spp.cPCR-SC. Ainda assim, observa-se que a qPCR associada a técnicas de amostragem não invasivas, como o suabe conjuntival, mostrou-se eficaz na detecção de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos. Além disso, o suabe conjuntival mostrou ser uma alternativa fácil e prática de obter amostras biológicas, especialmente em gatos, e representa um grande potencial na contribuição para o diagnóstico das leishmanioses.

Pela inf.cPCR-SG foi possível a detecção de equinos infectados por *L. infantum*, sendo esse, o primeiro estudo a confirmar a infecção em equinos por sequenciamento.

A ausência de sinais clínicos, associado à positividade dos animais pela PCR, sugere a atuação de cães, gatos e equinos como portadores sãos e consequentemente, possíveis fontes de infecção para as leishmanioses, inclusive equinos para a LV.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, M. M. dos S. et al. **Studies on the feeding habits of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American visceral leishmaniasis in northeastern Brazil.** Journal of tropical medicine, v. 2012, 2012.

AGUILAR, C. M. et al. **Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 84, n. 1, p. 19-28, 1989.

AGUILAR, C. M.; RANGEL, E. F.; DEANE, L. M. **Cutaneous leishmaniasis in frequent in equines from an endemic area in Rio de Janeiro, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 81, n. 4, p. 471-472, 1986.

AGUILAR, C.M. et al. ***Leishmania braziliensis braziliensis* in donkeys, *Equus asinus*, in Central Venezuela.** IX Reun. An. Pesq. Bás. Doença de Chagas, Caxambu, Abstracts. 120p. 1982.

AGUILAR, C.M. **Leishmaniasis tegumentária en los caserios Solano y Valle Hondo del Estado Cojedes. Participacion de los animales domésticos.** Thesis, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela. 108p. 1985.

ALENCAR, J.E. **Um caso de leishmaniose tegumentar em *Equus asinus*.** In: XIV Congresso Brasileiro de Higiene, Niterói, Brasil. 1959.

ALTSCHUL, S.F. et al. **Basic Local Alignment Search Tool.** Journal of Molecular Biology, Londres, v. 215, p. 403-410, 1990.

ALVAR, J. et al. **Canine leishmaniasis.** Advances in Parasitology, Londres, v.57, p.1-88, 2004.

ARIAS, J. et al. **Epidemiologia y control de la leishmaniasis em la Américas, por país o territorio. Washington.** Organización Panamericana de la Salud (OPAS), 52p, 1996. (Cuaderno Técnico, 44).

AYLLON, T. et al. **Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain.** Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1149, n. 1, p. 361-364, 2008.

BANETH, G. et al. **Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one.** Trends in parasitology, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

BASTIEN, P.; PROCOP, G. W.; REISCHL, U. **Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR.** Journal of clinical microbiology, v. 46, n. 6, p. 1897-1900, 2008.

BENVENGA, G. U. **Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos no Estado de São Paulo.** 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.

BERN, C.; COURTENAY, O.; ALVAR, J. **Of cattle, sand flies and men: a systematic review of risk factor analyses for South Asian visceral leishmaniasis and implications for elimination.** PLoS neglected tropical diseases, v.4, n. 2, e599p., 2010.

BERN, C.; COURTENAY, O.; ALVAR, J. **Of cattle, sand flies and men: a systematic review of risk factor analyses for South Asian visceral leishmaniasis and implications for elimination.** PLoS neglected tropical diseases, v. 4, n. 2, e599p., 2010.

BONFANTE-GARRIDO, R. et al. **Enzootic equine cutaneous leishmaniasis in Venezuela.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 75, 471p, 1981.

BORCHERS, K. et al. **Prevalence of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) DNA in ocular swabs and its cell tropism in equine conjunctiva**. Veterinary microbiology, v. 118, n. 3, p. 260-266, 2006.

BOSSOLASCO, S. et al. **Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis**. Journal of clinical microbiology, v. 42, n. 4, 1858p., 2004.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. **Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde – **Leishmaniose Visceral: Descrição da Doença**. Brasília. Disponível em: <www.saude.gov.br> Acesso em: 23.mar.2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Tegumentar: Situação Epidemiológica - Dados**. Disponível em: <www.saude.gov.br> Acesso em 15 abr. 2015b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. Brasília. Editora do Ministério da Saúde. 2ed, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2006, 120p.

CABRERA, M. A. A. et al. **Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 45, p. 79-83, 2003.

CAMARGO-NEVES, V.L.F. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo**. São Paulo. 158p. 2010. Disponível

em: < http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_leishvis.html> Acesso em 23 mar. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Parasites - Leishmaniasis: Resources for Health Professionals**. 2014. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis>> Acesso em: 23 mar. 2015.

CERBINO-NETO, J.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. N. **Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil**. Cadernos de Saúde Pública, v. 25, n. 7, p. 1543-1551, 2009.

CHAGAS E. et al. **Leishmaniose visceral americana (Relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937)**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.33, p.89-283, 1938.

CHAGAS, E. **Primeira verificação em indivíduo vivo da Leishmaniose visceral no Brasil**. Brasil Médico, v. 50, p.221-222, 1936.

CIARAMELLA, P. et al. **A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum***. Veterinary Record, v. 141, p. 539-543, 1997.

CORTES, S. et al. **PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* sl-specific kinetoplastid oligonucleotídeos**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 98, n. 1, p. 12-17, 2004.

COSTA, C. H. N. **Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil**. Cadernos de Saúde Pública, v. 24, n. 12, p. 2959-2963, 2008.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. **Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.

COSTA, L. N. G. et al. **Evaluation of PCR in the diagnosis of canine leishmaniasis in two different epidemiological regions: Campinas (SP) and Teresina (PI), Brazil.** *Epidemiology and infection*, v. 7, 2014.

CRUZ, I. et al. **Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis.** *Journal of clinical microbiology*, v. 44, n. 7, p. 2343-2347, 2006.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. **Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* n.sp.** *Nota prévia. Hospital*, v. 11, n. 2, p.3-9, 1937.

CUPOLILLO, E. et al. **Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 7, p. 3126-3132, 2003.

DA SILVA, R. N. et al. **Real-time PCR in clinical practice: a powerful tool for evaluating *Leishmania chagasi* loads in naturally infected dogs.** *Annals of tropical medicine and parasitology*, v. 104, n. 2, p. 137-143, 2010.

DA SILVEIRA NETO, L. et al. **Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in *Felis catus*.** *Veterinary Parasitology*, v. 177, n. 3, p. 374-377, 2011.

DE ARRUDA, Leishmanioses. In:___**Manual de Zoonoses**. Paraná. V.1, 2ed. 90p. 2010. Disponível em: < <http://www.zoonoses.org.br/zoonoses>> Acesso em 23 mar. 2015.

DEANE, L. **Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará.** Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956.

DEANE, L. M.; DEANE, M.P. **Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará.** O Hospital, Rio de Janeiro, v.47, p.75-87, 1955.

FALQUETO, A.; VAREJÃO, J. B. M.; SESSA, P. A.. **Cutaneous leishmaniasis in a horse (*Equus caballus*) from endemic area in the state of Espírito Santo, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 82, n. 3, p. 443-443, 1987.

FELICIANGELI, M. D. **Natural breeding places of phlebotomine sandflies.** Medical and veterinary entomology, v. 18, n. 1, p. 71-80, 2004.

FELIPE, I. M. A. et al. ***Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 106, n. 2, p. 207-211, 2011.

FERREIRA, S. A. et al. **Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil.** Veterinary Parasitology, Amsterdam, v.152, p. 257-263, 2008.

FERRER, L. et al. **Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis.** Veterinary Record, London, v.136, p.514-516, 1995.

FRANÇA-SILVA. J.C. **Distribuição Espacial e Temporal da Leishmaniose Visceral Canina em Relação à Densidade Vetorial e ao Controle de Cães Infectados em Porteirinha-Minas Gerais (1998-2002),** PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2003.

FRANCINO, O. et al. **Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis.** Veterinary Parasitology, v. 137, p.214-221, 2006.

GAMA, A. et al. **Cutaneous leishmaniosis in a horse from northern Portugal.** Veterinary Parasitology. v. 24, p.189-92, 2014.

GAVGANI, A.S. et al. **Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum***. American Journal of tropical medicine and hygiene, v. 67, n. 5, p. 511-515, 2002.

GEISWEID, K. et al. **Evaluation of a conjunctival swab polymerase chain reaction for the detection of *Leishmania infantum* in dogs in a non-endemic area**. The Veterinary Journal, v. 198, n. 1, p. 187-192, 2013.

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

GOMES, Y. M. et al. **Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances**. The Veterinary Journal, v. 175, n. 1, p. 45-52, 2008.

GONTIJO, C. M. F; MELO, M. N. **Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas**. Revista Brasileira de Epidemiologia, v.7, p. 338-347, 2004.

GRIMALDI, G. et al. **Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 106, n. 1, p. 54-59, 2012.

HATAM, G. R. et al. **First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran**. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, v. 10, n. 3, p. 313-316, 2010.

HOTEZ, P.J. et al. **Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project**. Clinical infectious diseases, v 38, p. 871–878, 2004.

HOTEZ, P.J. et al. **Incorporating a Rapid-Impact Package for Neglected Tropical Diseases with Programs for HIV/AIDS, Tuberculosis, and Malaria**. PLoS Medicine, v. 3, e102p., 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Cidades:** São Paulo. Disponível em < <http://www.cidades.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 abr. 2015.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS BIO-MANGUINHOS. Bio-Manguinhos/Fiocruz 2014. **Leishmaniose Canina.** 2012. Disponível em: < <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/reativos/ensaios-sorologicos/imunoenzimatico/leishmaniose-canina>>. Acesso em: 24 mai. 2015.

JOHN S.W., WEITZNER G., ROZEN R., SCRIVER C.R. **A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes.** Nucleic Acids Research, v.192, p. 408-408, 1991.

KOEHLER, K. et al. **Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*.** Veterinary Parasitology. v. 109, p.9–17, 2002.

KOUTINAS, A. F. et al. **Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996).** Journal of the American Animal Hospital Association, v. 35, n. 5, p. 376-383, 1999.

KUMAR, R. et al. **Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Bikaner, India: parasite identification and characterization using molecular and immunologic tools.** The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 76, n. 5, p. 896-901, 2007.

KUHLS, K. et al. **Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin.** PLoS Neglected Tropical Disease, v. 5, e1155 p., 2011.

LACHAUD, L. et al. **Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis.** Journal of Clinical Microbiology, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.

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

LAINSON R.; RANGEL E.F. **Ecologia das leishmanioses: *Lutzomyia longipalpis* e a eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana (LVA) no Brasil.** In E.F. Rangel, R. Lainson (eds), Flebotomíneos do Brasil, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 311-336. 2003.

LAINSON R.; SHAW J.J. **Leishmaniasis in the New World.** In L. Collier, A. Balows, M. Sussman (eds), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th ed., v. 5, Parasitology, Arnold, London, p. 313-349. 2005.

LAINSON, R. et al. **Amazonian visceral leishmaniasis - Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p.135-137, 1990.

LAINSON, R. et al. **American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. v. 81, 517p., 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v.81, 517p., 1987.

LANDIS, J.R., KOCH, G.G. **The measurement of observer agreement for categorical data.** Biometrics, v.33, p.159-174, 1977.

LEITE, R. S. et al. **Evaluation of conjunctival swab as a mass-screening tool for molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis.** Parasitology research, v. 114, n. 6, p. 2255-2262, 2015.

LEITE, R. S. et al. **PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab sample**. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 170, p. 201-206, 2010.

LOMBARDO, G. et al. **Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques**. Veterinary parasitology, v. 184, n. 1, p. 10-17, 2012.

LOPES, E. G. P. et al. **Temporal and spatial distribution of leishmaniasis in humans and dogs from Belo Horizonte-MG, 1993-2007**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 62, n. 5, p. 1062-1071, 2010.

MAIA, C. et al. **Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues**. The Veterinary Journal, v. 179, n. 1, p. 142-144, 2009.

MAIA, C.; CAMPINO, L. **Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection**. Veterinary parasitology, v. 158, n. 4, p. 274-287, 2008.

MANCIANTI, F. et al. **Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 82, n. 4, p. 566-567, 1988.

MANNA, L. et al. ***Leishmania* DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine**. Annals of New York Academy of Sciences. V. 1149, p. 358-60, 2008a.

MANNA, L. et al. **Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol**. Veterinary Journal. v. 177, p.279-82, 2008b.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. **Leishmaniose visceral no Brasil**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MARQUES, C.S. et al. Detection of Leishmania infection in Cats by qPCR of blood and conjunctival swabs and by indirect immunofluorescence assay. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 5., 2013, Porto de Galinhas, Pernambuco. Abstract Book, Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, 242p., 2013.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J. et al. **Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain**. Veterinary Parasitology, v. 145, n. 3, p. 267-273, 2007.

MARY, C. et al. **Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity**. Journal of Clinical Microbiology, v. 42, n. 11, p. 5249-5255, 2004.

MAURICIO, I. L. et al. **Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex**. Parasitology, v. 119, n. 03, p. 237-246, 1999

MAZZA, S. **Leishmaniasis cutánea en el caballo y nueva observación de la misma en el perro**. Boletín. Universidad de Buenos Aires. Instituto de Clínica Quirúrgica, v. 3, p. 462-4, 1927.

METTLER, M. et al. **Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs**. Journal of clinical microbiology, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.

MIRÓ, G. et al. **Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two**. Trends in parasitology, v. 24, n. 8, p. 371-377, 2008.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. **Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.41, 2008.

MOHAMMADIHA, A. et al. **Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples.** Experimental parasitology, v. 133, n. 1, p. 89-94, 2013.

MONTEIRO, E. M. et al. **Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 38(2):147-152. mar./abr., 2005.

MORENO, J.; ALVAR, J. **Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model.** Trends in parasitology, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

NASEREDDIN, A.; SALANT, H.; ABDEEN, Z. **Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation.** Veterinary Parasitology, v. 158, n. 4, p. 364-369, 2008.

NEVES, D.P.; Gênero *Leishmania*. In:___Parasitologia Dinâmica. São Paulo. 2ed. Ed. Atheneu. p.83-88, 2006.

NICOLLE G.; COMTE M. **Recherches sur la kala-azar enterprises a l'Institut Pasteur de Tunis. IV. Origine canine du kala-azar.** Archives de l'Institut Pasteur de Tunis, v.3, p.59-62, 1908.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. **PCR em Tempo Real.** Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v.33, p.10-13, 2004.

NOYES, H. **Implications of a Neotropical origin of the genus *Leishmania*.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 93, n. 5, p. 657-662, 1998.

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

OZON, C. et al. **Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France.** Veterinary Parasitology, v. 75, n. 2, p. 273-277, 1998.

PALTRINIERI, S. et al. **Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs.** Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

PENNISI, M. G. **A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution.** In: Killick-Kendrick, R. (Ed.), Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution. Intervet International, Boxmeer, p.39–48, 2002.

PENNISI, M. G. et al. **Leishmaniosis in cats ABCD guidelines on prevention and management.** Journal of feline medicine and surgery, v. 15, n. 7, p. 638-642, 2013.

PENNISI, M. G. **La leishmaniosi felina dalla A alla Z. Gruppo di Studio sulla Leishmaniosi Canina (Ed.), Leishmaniosi canina.** Edizioni Veterinarie, p. 59-64, 2010.

PEREIRA, V. F. et al. **Conjunctival swab for canine leishmaniasis detection by PCR.** In: FAMERP-UTMB: Emerging infections in the Americas – common interests and collaboration between Brazil and USA, São José do Rio Preto, 2012.

PISANI, E. H. R.; DE MORAES BARROS, P. S.; DE AVILA, F. A. **Microbiota conjuntival normal de eqüinos Departamento de. Brazilian.** Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 34, n. 5, p. 261-265, 1997.

POLI, A. et al. **Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy.** Veterinary Parasitology, v. 106, n. 3, p. 181-191, 2002.

OLIVEIRA, T.M.F.S. et al. **Applying conjunctival swab PCR to detection *Leishmania* spp. in cats.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 2, no prelo 2015.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. **Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis.** Parasitology, v. 136, n. 14, p. 1915-1934, 2009.

QUINNELL, R. J.; DYE, C.; SHAW, J. J. **Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil.** Medical and veterinary entomology, v.6, n. 3, p.195-200, 1992.

RAMOS-VARA, J.A. et al. **Cutaneous leishmaniasis in two horses.** Veterinary Pathology. v.33, p.731–734, 1996.

RANASINGHE, S. et al. **A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 102, n. 9, p. 875-882, 2008.

REIS, A. B. et al. **Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*.** Veterinary immunology and immunopathology, v. 112, n. 3, p. 102-116, 2006.

REIS, A. B. et al. **Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis.** Veterinary immunology and immunopathology, v. 128, n. 1, p. 87-95, 2009.

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

ROLÃO, N. et al. **Equine infection with *Leishmania* in Portugal.** Parasite, v. 12, n. 2, p. 183-186, 2005.

RÜFENACHT, S. et al. **Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland.** The Veterinary Record, v. 156, n. 17, p. 542-545, 2005.

SAMUELSON, D. A.; ANDRESEN, T. L.; GWIN, R. M. **Conjunctival fungal flora in horses, cattle, dogs, and cats.** Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 184, n. 10, p. 1240-1242, 1984.

SANTA ROSA, A. C. I.; OLIVEIRA, S. C. I.; **Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente.** Clínica Veterinária, São Paulo, n.11, 1997. São Luís. Anais do XVII Congresso de Parasitologia Veterinária, 204p., 2012.

SÃO PAULO (Estado). Centro de vigilância epidemiológica (CVE), **Leishmaniose Visceral Americana Humana.** Distribuição do número de casos e óbitos de LVA segundo município e GVE de infecção. Estado de São Paulo, 2010 a 2013. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Acesso em: 24 mai. 2015.

SÃO PAULO (Estado). Centro de vigilância epidemiológica (CVE), **Leishmaniose Tegumentar Americana. Casos Confirmados segundo GVE de Notificação e Ano de Diagnóstico e segundo GVE de Residência e Ano de Diagnóstico. Estado de São Paulo, 2007 a 2015.** Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Acesso em: 02 mai. 2015.

SARKARI, B. et al. **Seroprevalence of feline leishmaniasis in areas of Iran where Leishmania infantum is endemic.** Annals of tropical medicine and parasitology, v. 103, n. 3, p. 275-277, 2009.

SAVANI, E. S. M. M. et al. **The first record in the Americas of an autochthonous case of Leishmania (Leishmania) infantum chagasi in a domestic cat (Felix catus) from Cotia County, São Paulo State, Brazil.** Veterinary Parasitology, v. 120, n. 3, p. 229-233, 2004.

SCHULZ, A. et al. **Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic Leishmania organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based**

real-time PCR assay. Journal of Clinical Microbiology, v. 41, n.4, p. 1529-1553, 2003.

SERGENT, E. et al. **La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation.** Bulletin de la Société de pathologie exotique (1990), v. 5, p. 93-98, 1912.

SHAW, J.J. **Further thoughts on the use of tech anme *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* dor the aetiological agent of American visceral leishmaniasis.** Memória do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.101, n.5, p.577-579, 2006.

SHERLOCK, I. A. et al. **Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.79, n.4, p.511, 1984.

SILVA, E. S. et al. **Visceral leishmaniasis in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeast Brazil.** Veterinary Record, London, v. 147, p. 421 -422, 2000.

SLAPPENDEL, R.J.; GREENE, C. E. **Leishmaniasis.** In: Greene, C.E. Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: W.B. Saunders, p.450-458. 1990.

SOARES, I. R. et al. **First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*.** Veterinary parasitology, v. 197, n. 3, p. 665-669, 2013.

SOARES, I.R. et al. **Leishmaniose tegumentar americana por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cavalo de área Metropolitana de Belo Horizonte, MG, Brasil.** In: XVII CONGRESSO DE PARASITOLOGIAVETERINÁRIA, 2012.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. **Cutaneous leishmaniosis in three horsesin Spain.** Equine Veterinary Journal, v. 35, p.320–323, 2003.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. **Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis.** Veterinary Parasitology, v. 147, n. 3, p. 315-319, 2007.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. **LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis.** Parasites & vectors, v. 4, n. 1, p. 86, 2011.

STRAUSS-AYALI, D. et al. **Polimerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs.** Journal of Infectious Diseases, v. 189, p. 1779-33, 2004.

TRUPPEL, J. H. et al. **Can Equids Be a Reservoir of *Leishmania braziliensis* in Endemic Areas?** PloS one, v. 9, n. 4, p. e93731, 2014.

TUPPERWAR, N. et al. **Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen.** Diagnostic microbiology and infectious disease, v. 61, n. 1, p. 23-30, 2008.

VEDOVELLO-FILHO, D. et al. **American Cutaneous Leishmaniasis in Horses from Endemic Areas in the North-Central Mesoregion of Paraná State, Brazil.** Zoonoses and public health, v. 55, n. 3, p. 149-155, 2008.

VEXENAT, J.A. et al. **Infecção natural de *Equus asinus* por *Leishmania braziliensis braziliensis*.** Bahia, Brasil. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, v.81, p.237–238. 1986.

VIDES, J.P. et al. ***Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from na endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil.** Veterinary Parasitology, v.178, p.22-28, 2011.

VIEIRA, J.B.F.; COELHO, G. E. **Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 31, n. supl II, p. 85-92, 1998.

WERNECK, G. L. **Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil**. Introduction. Cadernos de Saúde Pública, v. 24, n. 12, p. 2937-2940, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**: Situation and trends. Disponível em: < http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/> Acesso em: 23 mar. 2015.

YOSHIDA, E. L. A. et al. **Infecção natural de Equus caballus por Leishmania sp- São Paulo, Brasil (Breve comunicação científica)**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 30, n. 2, p. 79-80, 1988.