

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG

JULIANA BARBOSA NUNES

**INQUÉRITO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA NO MUNICÍPIO DE ALFENAS-MG**

Alfenas/MG
2015

JULIANA BARBOSA NUNES

**INQUÉRITO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA NO MUNICÍPIO DE ALFENAS-MG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à saúde da Universidade Federal Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Dr. Alessandro Antonio Costa Pereira.

Co-orientador: Dr. Marcos José Marques.

Alfenas/MG
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Nunes, Juliana Barbosa.

Inquérito sorológico e molecular de leishmaniose visceral canina no município de Alfenas-MG \ Juliana Barbosa Nunes. -- Alfenas/MG, 2015. 82 f.

Orientador: Alessandro Antônio Costa Pereira
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas.
Bibliografia.

1. Leishmaniose Visceral Canina. 2. Testes Sorológicos. 3. Patologia Molecular. 4. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala. I. Pereira, Alessandro Antônio Costa. II. Título.

CDD-616.96

JULIANA BARBOSA NUNES

INQUÉRITO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA NO MUNICÍPIO DE ALFENAS-MG

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aprovada em: 7 de agosto de 2015

Profº. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira

Instituição: Unifal

Assinatura:



Profº. Dra. Márcia Dalstra Laurenti

Instituição: USP

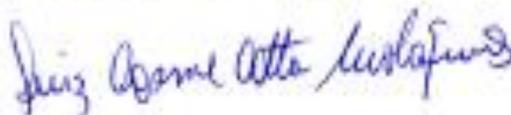
Assinatura:



Profº. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias

Instituição: Unifal

Assinatura:



DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais pelo incentivo e apoio durante toda a minha vida, meu companheiro Ricardo por todo apoio, dedicação, compreensão e por estar sempre ao meu lado. À Dra Herminia por toda ajuda, conselhos, orientação, pelas estadias em sua casa e todos os ensinamentos de grande valia nesse período. Aos cães, pois sem eles nada teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos orientadores **Dr. Alessandro Antonio Costa Pereira, Dr. Marcos José Marques** por todos os ensinamentos, paciência nas idas e vindas ao canil e Paraguaçu, por ter me ajudado a chegar a todo o aprendizado, por sempre acreditar mesmo que em mínimas possibilidades e pela amizade oferecida.

Ao **Dr. Fabio Antonio Colombo** pela paciência, pelo imenso aprendizado, pela amizade, companheirismo, pelos cafés e conversas, congressos e experiências que compartilhou que irei levar por toda minha vida.

À **Dra. Herminia Yohko Kanamura** por compartilhar um pouquinho de sua experiência, por todas as viagens e idas a São Paulo, por me permitir conhecer um universo dentro da pesquisa em diversos ambientes, meus sinceros agradecimentos.

À **Dra. Rita Maria da Silva, Dra. Silvia Regina Baraldi, Héliid Raquel R. R. de Lucca** e a todos do Instituto Adolfo Lutz – Rio Claro/SP pelo treinamento em técnicas sorológicas, por me receberem tão carinhosamente, pela companhia nos congressos e pela amizade.

À **Dra. Márcia Dalastra Laurenti** e a **Tháise Yumie Tomokane** pelo treinamento e realização dos testes de Elisa e pelo carinho nos meus incessantes e-mails.

À **Dra. Solange Maria Gennari**, Ao **Dr. Marcelo Bahia Labruna**, Ao **Dr Arlei Marcili**, À **Dra Hilda Fátima de Jesus Pena** por todo o ensinamento, treinamento e disponibilidade para realização dos meus testes.

Ao **Dr. Carlos Frederico Loiola** por nos ceder as armadilhas para a captura dos flebotomíneos.

Aos alunos de graduação, mestrado, doutorado, pós docs, técnicos do setor de Medicina Veterinária Preventiva da USP pela ótima recepção, pela ajuda, apoio, pela companhia nos almoços e a todos que de alguma forma contribuíram para realização dos meus experimentos, muito obrigada.

Aos meus primos Rodrigo, Camila e Sara por me acolherem em sua casa durante o período de estadia em São Paulo.

Aos médicos veterinários pelo fornecimento das amostras nos casos caninos suspeitos.

Aos funcionários do canil municipal juntamente com o médico veterinário por permitir e nos auxiliar nas coletas de amostras.

Ao setores da vigilância epidemiológica, secretaria municipal e regional de saúde por permitir a realização do estudo no município.

Aos queridos amigos da Biomol Dani, Andreisa, Amanda, Matheus, Rayssa, Joana, Aline, Franciele, Patrícia, Fran, Carolina, Fernanda e aos novos membros pela companhia, risadas e amizade.

Aos membros da banca de qualificação e defesa pelas sugestões para o enriquecimento deste trabalho.

À Capes e Unifal pelo apoio.

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença crônica, sistêmica e o cão é considerado o principal reservatório doméstico do parasito. Os programas de controle preconizam a realização de inquéritos sorológicos para a identificação dos cães positivos, pois a infecção canina precede à humana. Este trabalho é uma investigação sorológica e molecular da LVC no município de Alfenas-MG, área considerada não endêmica para a doença, porém com fluxo de demandantes de serviços de saúde e estudantes de diferentes regiões do país, algumas endêmicas para esta doença. A detecção da infecção por *Leishmania (L.) infantum chagasi* foi realizada por métodos sorológicos (teste rápido imunocromatográfico DPP® Bio-Manguinhos, ELISA e RIFI ambas *in house*) em 87 amostras de soro, e por métodos moleculares, com PCR convencional (RV1/RV2) e PCR em Tempo Real (Linj31, Ldon and DNAPol) em 87 amostras de sangue total de cães provenientes do canil municipal e de clínicas veterinárias do município. Para avaliar a reatividade cruzada com outros agentes, 87 amostras foram submetidas à reação de RIFI para *Toxoplasma gondii*, e 66 amostras foram submetidas a RIFI para *Neospora caninum* e *Rickettsia* spp. e à PCR convencional para os genes SSU rDNA, alvo para *Trypanosoma cruzi*, citocromo B para tripanosomatídeos e o gene quitinase relacionado com interação entre flebotomíneos e *Leishmania* sp. Os resultados apontam que das 87 amostras de soro analisadas, oito (9,0%) foram reagentes para LVC no DPP®, mas somente duas (2,3%) foram confirmadas pelo ELISA e duas (2,3%) apresentaram-se como indeterminadas. Nos testes moleculares, das 91 amostras analisadas (87 amostras de sangue total, dois fragmentos de baço e dois de fígado), quatro amostras (4,4%) foram positivas para o PCR Convencional, com o marcador RV1/RV2, e seis (6,6%) para o PCR em Tempo Real, com os marcadores Linj31, Ldon e DNAPol. As duas amostras de baço e as duas de fígado foram positivas nos dois procedimentos moleculares empregados, enquanto que duas amostras de sangue (2,2%), foram positivas apenas no PCR em Tempo Real. Os resultados de sequenciamento apresentaram total identidade com *L. (L.) chagasi* (acesso AJ000304.1). Nos testes para outros parasitos, 30 amostras (34,5%) foram positivas para *T. gondii*, enquanto que para *N. caninum* somente uma amostra (1,5%) apresentou resultado positivo. Todos os animais do canil eram assintomáticos, o que leva a sugerir que os resultados

de sorologia positiva encontrados possam ser devido a reações cruzadas com outros parasitos. Assim, esses resultados indicam que não estaria ocorrendo transmissão desta parasitose entre os residentes no canil municipal de Alfenas. No entanto foram confirmados os primeiros casos de LVC na região de Alfenas, cães estes atendidos em clínicas veterinárias do município, embora não seja possível afirmar-se que possa estar ocorrendo a transmissão entre cães advindos de clínicas veterinárias, uma vez que não foi possível determinar a procedência dos mesmos. O Ministério da Saúde preconiza o DPP® como triagem e ELISA como confirmatório, porém outros testes são necessários para o diagnóstico conclusivo, visto que os testes sorológicos apresentaram reações cruzadas, podendo gerar resultados falsos positivos.

Palavras chave: Leishmaniose visceral canina. Testes sorológicos. Patologia molecular. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a chronic, systemic disease, and the dog is considered the main domestic reservoir of the parasite. The control programs recommend the conduction of serological surveys for the identification of serologically positive dogs, since the canine infection precedes the human infection. This is a study for serological and molecular investigation of CVL in the municipality of Alfenas-MG, located in area that is considered non-endemic for the disease, but with large flow of health service demand and presence of students from different regions of the country, including ones that are endemic for this disease. Detection of *L. (L.) infantum chagasi* infection in dogs was performed by serological methods (Immunochromatographic rapid test DPP® Bio-Manguinhos, ELISA and IFAT both in house), in 87 serum samples, and by molecular methods, with conventional PCR (RV1/RV2) and Real-Time PCR (Linj31, Ldon and DNAPOL), in 87 whole blood samples from de municipal kennel and veterinary clinics in the County. To evaluate cross-reactivity with other agents, 87 serum samples were submited to reaction of IFAT for *Toxoplasma gondii*, and 66 samples were submited to IFAT for *Neospora caninum* and *Rickettsia spp.* and conventional PCR to SSU rDNA genes, target for *Trypanosoma cruzi*, to cytochrome B for trypanosomatids and chitinase gene related to interaction between phlebotomines and *Leishmania sp.* The results show that of the 87 samples analyzed, eight (9%) were positive in the rapid test DPP®, but only two (2.3%) were confirmed by ELISA and two (2.3%) were undetermined. In the molecular tests using conventional PCR, 91 samples analysed (87 of whole blood, two spleen fragments and two liver fragment), four samples (4.4%) were positive for the conventional PCR with the marker RV1/RV2, and six samples (6.6%) for the real-time PCR, with Linj31, Ldon, and DNAPol markers. Two samples of spleen and liver were positive on the two procedures employed, while two whole blood (2.2%) were positive only in real time PCR. The sequencing results showed total identity with *L. (L.) chagasi* (access AJ 000304.1). In testing for other parasites, 30 samples (34.5%) were positive for *T. gondii*, while for *N. caninum* only a sample (1.5%) showed positive result. All animals in the Kennel were asymptomatic, which leads to suggest that positive serology results found may be due to cross-reactivity with other parasites. Thus, these results indicate that would not be occurring this transmission of this parasites among residents in the municipal Kennel of Alfenas. However were confirmed the first cases of CVL in the

region of Alfenas, these dogs attended in veterinary clinics in the municipality, although it is not possible to say that might be occurring transmission between dogs from veterinary clinics, since it has not possible to determine the origin of them. The Ministry of health recommends the DPP ® as ELISA screening and confirmatory tests, but others such as are required for the diagnosis conclusive, inasmuch as the serologic tests showed cross-reactivity and can generate false positives.

Key words: Canine visceral leishmaniasis. Serologic Tests. Pathology, Molecular. High-Throughput Nucleotide Sequencing.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras de cães positivos em testes sorológicos para LVC.....	50
Tabela 2 - Amostras de cães positivos em testes sorológicos.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo biológico das <i>Leishmania spp</i>	19
Figura 2 -	Taxa de Incidência e número de óbitos notificados entre os anos de 2001 e 2013 de Leishmaniose visceral	20
Figura 3 -	Teste rápido imunocromatográfico Dual Path Plataform (DPP®) ..	37
Figura 4 -	Cães n° 67 e 68 sintomáticos para LVC	47
Figura 5 -	Amostra de cão positiva em teste rápido DPP®, com presença de banda no teste (T) e no controle (C) (26 e 67)	48
Figura 6 -	Distribuição dos resultados de DO obtidos no teste de ELISA para LVC das 87 amostras de soro	49
Figura 7 -	Fluorescência dos parasitos, observada em amostra de cão positiva, submetida à reação de imunofluorescência indireta com formas promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	49
Figura 8 -	Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (1-17).....	50
Figura 9 -	Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (18-28).....	51
Figura 10 -	Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (29-45).....	51
Figura 11 -	Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (46-64).....	51
Figura 12 -	Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (65-66).....	52
Figura 13 -	Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (67-68).....	52
Figura 14 -	Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (69-76).....	52
Figura 15 -	Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (77-84).....	53
Figura 16 -	Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (89-91).....	53
Figura 17 -	Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de	

	produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (animais que apresentaram resultados positivos em sorologia 24, 26, 39, 44, 48 e 56).....	54
Figura 18 -	Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (67 e 68).....	54
Figura 19-	Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos das amostras de baço e fígado dos cães 67 e 68	55
Figura 20 -	Formas amastigotas observadas após coloração por Panótico Rápido® em <i>imprinting</i> de baço	56
Figura 21 -	Eletroforese em gel de agarose 1,5% corados por SYBR® Safe DNA Gel Stain de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (1-11).....	60
Figura 22 -	Eletroforese em gel de agarose 1,5% corados por SYBR® Safe DNA Gel Stain de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (12-17).....	60
Figura 23 -	Eletroforese em gel de agarose 1,5% corados por SYBR® Safe DNA Gel Stain de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (1-17).....	61
Figura 24 -	Eletroforese em gel de agarose 1,5% corados por SYBR® Safe DNA Gel Stain de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (18-35).....	61
Figura 25 -	Eletroforese em gel de agarose 1,5% corados por SYBR® Safe DNA Gel Stain de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (36-38; 40-53).....	61
Figura 26 -	Eletroforese em gel de agarose 1,5% corados por SYBR® Safe DNA Gel Stain de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (54-66; 39).....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µl	Microlitro
µM	Micromolar
18s	subunidade menor do RNAr
ACK	tampão de lise de eritrócitos
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention”
cDNA	DNA complementar
CT	Cycle threshold
cut-off	limite de corte/ponto de corte
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPP®	Teste rápido imunocromatográfico DPP®
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra - acético
ELISA	“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”
g	Aceleração da gravidade terrestre (9,8m/s ²)
g	grama(s)
gp63	glicoproteína de superfície de 63kDa
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFAT	Indirect fluorescent antibody test
IgG	Imunoglobulina G
ITS	Região espaçadora transcrita
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodalton
kDNA	DNA do cinetoplasto
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
mg	miligrama(s)
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
mM	milimolar
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Concentração de hidrogênio iônico
pNPP	Para-fenilfosfato
qPCR	PCR em tempo real
rDNA	DNA ribossomal
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RNA	Acido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
TBE	Tris/ Borato/ EDTA
Tris-HCl	Tampão tris-ácido
UI/mL	Unidade internacional por mililitro
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	CLASSIFICAÇÃO	19
2.2	MORFOLOGIA	19
2.3	CICLO BIOLÓGICO	20
2.4	EPIDEMIOLOGIA	21
2.5	LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA	22
2.6	RESERVATÓRIOS	24
2.7	PRINCIPAIS VETORES	26
2.8	DIAGNÓSTICO	28
2.8.1	Métodos sorológicos	29
2.8.2	Métodos moleculares	31
2.9	REAÇÕES CRUZADAS	32
3	JUSTIFICATIVA	34
4	OBJETIVOS	36
4.1	GERAL	36
4.2	ESPECÍFICOS	36
5	MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1	AMOSTRAS	37
5.2	AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS	38
5.3	COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO	38
5.4	DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL NOS CÃES AMOSTRADOS	38
5.4.1	Diagnóstico sorológico	39
5.4.1.1	Protocolo do Teste Rápido Imunocromatográfico DPP® Bio-Manguinhos	39
5.4.1.2	ELISA	39
5.4.1.3	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	40
5.4.1.3.1	<i>Produção do antígeno</i>	40
5.4.1.3.2	<i>Protocolo da RIFI</i>	41
5.4.2	Diagnóstico molecular	42
5.4.2.1	PCR Convencional	42
5.4.2.1.1	<i>Extração de DNA em amostra de sangue</i>	42
5.4.2.1.2	<i>Extração de DNA em amostra de tecido</i>	43
5.4.2.1.3	<i>Amplificação</i>	43
5.4.2.2	PCR em Tempo Real	44

5.4.2.2.1	<i>Linj31</i>	44
5.4.2.2.2	<i>Ldon</i>	45
5.4.2.2.3	<i>DNApol</i>	45
5.4.3	Diagnóstico parasitológico	46
5.5	SEQUENCIAMENTO	46
5.6	AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS QUANTO A POSSÍVEIS REAÇÕES CRUZADAS.....	47
5.7	INQUÉRITO DE FLEBOTOMÍNEOS.....	48
6	RESULTADOS	49
6.1	TESTE RÁPIDO IMUNOCROMATOGRÁFICO DPP® BIO- MANGUINHOS.....	50
6.2	ELISA	50
6.3	REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI).....	51
6.4	MÉTODOS MOLECULARES	52
6.4.1	PCR Convencional com os marcadores RV1/RV2	52
6.4.2	PCR em Tempo Real	56
6.5	PARASITOLÓGICO.....	58
6.6	SEQUENCIAMENTO	58
6.7	AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS QUANTO A POSSÍVEIS REAÇÕES CRUZADAS.....	59
6.7.1	RIFI para <i>Toxoplasma gondii</i>	59
6.7.2	RIFI para <i>Neospora caninum</i>	59
6.7.3	RIFI para <i>Rickettsia sp.</i>	59
6.7.4	PCR convencional para outros agentes	61
6.8	INQUÉRITO DE FLEBOTOMÍNEOS	64
7	DISCUSSÃO	65
8	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO	84

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem uma das mais significantes doenças tropicais negligenciadas, sendo que cerca de 350 milhões de pessoas que vivem em 88 países apresentam o risco de desenvolver alguma das formas da doença, seja a forma tegumentar ou visceral (KEDZIERSKI, 2010).

A leishmaniose visceral (LV), nas Américas, é considerada uma zoonose de grande impacto na saúde pública, caracterizada por elevada taxa de morbidade e letalidade. É uma zoonose infecto-parasitária de difícil controle devido à diversidade epidemiológica do agente *Leishmania spp.* Em função da grande diversidade e interação entre as espécies hospedeiras, aos reservatórios e vetores, a doença tem se expandido para diversas regiões (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

Seus vetores são flebotomíneos hematófagos, que ingerem, durante o repasto sanguíneo, a forma amastigota de *Leishmania* a qual se transforma na forma promastigota, no interior do intestino do inseto. Esta se divide, e no próximo repasto sanguíneo, os parasitos são inoculados em um novo hospedeiro (URQUHART, 1996).

É uma doença crônica, sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, perda de peso, anemia, hepato e esplenomegalia dentre outras manifestações. Quando não tratada, pode evoluir para óbito em grande número dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A infecção canina geralmente precede a ocorrência da doença em humanos e apesar de todas as medidas de controle adotadas até o momento (inquéritos sorológicos, eutanásia de cães soropositivos e controle dos vetores), nos últimos anos a doença tem se espalhado atingindo novas áreas (BRASIL, 2014; OLIVEIRA; MORAIS; MACHADO-COELHO, 2008; OLIVEIRA et al., 2001).

Encontra-se presente nas cinco regiões brasileiras. Os casos em humanos e caninos têm aumentado significativamente em áreas urbanas (BRASIL, 2014). Muitas espécies de mamíferos, como cães, gatos, canídeos silvestres, marsupiais e roedores são facilmente infectados por *Leishmania spp.* (QUINNELL; COURTENAY, 2009).

Desta forma o presente trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência de métodos sorológicos e moleculares na identificação de leishmaniose visceral canina em cães provenientes do canil municipal e clínicas veterinárias do município de Alfenas -MG.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A seguir será descrito a classificação, morfologia, ciclo biológico das leishmanioses, bem como detalhamento sobre leishmaniose visceral americana, principais reservatórios, diagnóstico e reações cruzadas.

2.1 CLASSIFICAÇÃO

As leishmanioses são causadas por diferentes espécies que pertencem ao Reino Protista, Sub-Reino Protozoa, compreendendo organismos unicelulares nucleados. Ao Filo Sarcomastigophora e ao Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophora, que compreende seres heterotróficos, ou seja, incapazes de produzir seu próprio alimento. Ordem Kinetoplastida, apresentando uma organela típica chamada cinetoplasto, que contém DNA. Família Trypanosomatidae, todos essencialmente parasitos. Ao Gênero *Leishmania*, que foi subdividido em dois subgêneros, contendo as espécies causadoras das leishmanioses de acordo com o local de desenvolvimento do parasito no interior do intestino do vetor, *Leishmania* em que a reprodução do parasito ocorre na porção anterior e média do intestino do flebotomíneo, de ocorrência no mundo todo; e *Viannia*, que possui uma fase prolongada da divisão ligada a parede posterior do intestino, seguida da migração de formas promastigotas para o intestino médio e anterior, com ocorrência somente nas Américas (LAINSON; SHAW, 1998; REY, 2001a). Sendo que no Novo Mundo a principal espécie causadora da forma visceral é *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (LAINSON; RANGEL, 2005).

2.2 MORFOLOGIA

Os parasitos da Família Trypanosomatidae possuem aspectos variados de acordo com a sua forma evolutiva e com o hospedeiro parasitado. Apresenta duas

formas durante seu ciclo: forma amastigota e forma promastigota. A forma amastigota é intracelular em tecidos no hospedeiro vertebrado, invadindo especialmente o sistema fagocítico mononuclear de vísceras como o baço, fígado, medula óssea e órgãos linfóides. Possui um corpo pequeno (2 a 6µm de comprimento por 1,5 a 3µm de largura) achatado, com núcleo relativamente grande e arredondado ocupando de metade a dois terços do corpo celular, apresenta o cinetoplasto bem visível e o flagelo reduzido. A forma promastigota se desenvolve no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados (flebotomíneos) ou em meios de culturas. Seu corpo alongado e achatado, caracterizado pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo. O cinetoplasto se encontra na posição anterior do parasito, próximo ao flagelo. Tem dimensões de 14 a 20µm de comprimento, por 1,5 a 4µm de largura, e são aeróbicos (REY, 2001a; COURA, 2005c).

O cinetoplasto possui um DNA específico representado pela sigla kDNA. O kDNA é constituído por milhares de minicírculos e por 20 a 50 maxicírculos, que codificam um pequeno número de RNA. O flagelo é composto por nove microtúbulos, dispostos em círculo e aos pares e mais dois centrais. (COURA, 2005c; GRIMALDI; TESH, 1993; REY, 2001a).

2.3 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo de vida apresenta dois momentos, um no hospedeiro vertebrado e outro no invertebrado (vetor). A reprodução desses parasitos ocorre pela divisão binária simples, onde a duplicação do cinetoplasto é anterior aos demais processos, iniciando pela produção de um novo flagelo. O núcleo se divide em seguida por endomitose.

O ciclo pode ser explicado e observado na Figura 1. O vetor infectado, durante o repasto sanguíneo, regurgita parte do conteúdo do seu tubo digestivo e inocula as formas promastigotas no hospedeiro vertebrado (1). As promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos e, dentro de um vacúolo (fagossomo) entre 1 a 4 horas se transforma em amastigotas (2), iniciando sua multiplicação por divisão binária dentro do vacúolo parasitóforo (3). Quando os macrófagos estão quase repletos com amastigotas (3), eles se rompem e infectam outros macrófagos e ocorre disseminação hematogena do parasito para os órgãos internos como baço e fígado e vários tipos de

tecido, onde se multiplicam por divisão binária (4). Quando o vetor se alimenta em um hospedeiro vertebrado infectado, ingere uma pequena quantidade de sangue com macrófagos contendo amastigotas (5), essas formas são transformadas em promastigotas no intestino (7), onde se multiplicam por divisão binária (6). Rapidamente essas formas bloqueiam o intestino do vetor, e se direcionam para a cavidade bucal (8), onde serão introduzidas no novo hospedeiro durante o próximo repasto sanguíneo (COURA, 2005a).

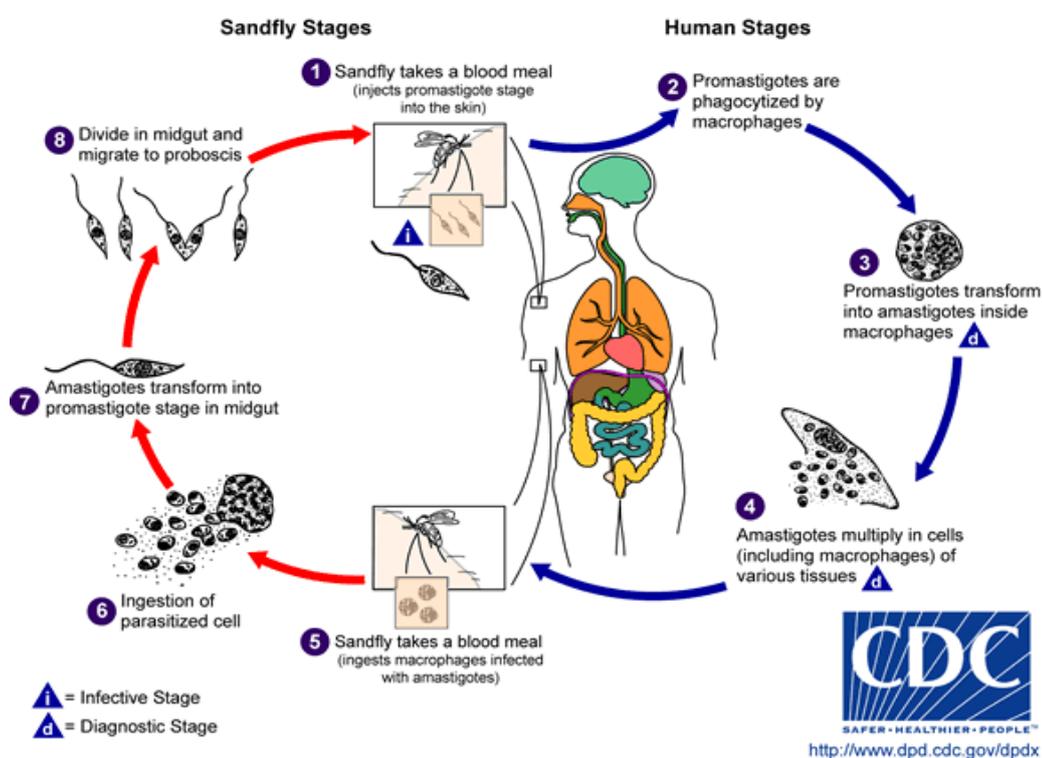


Figura 1 – Ciclo biológico das *Leishmania* spp.
 Fonte – CDC

2.4 EPIDEMIOLOGIA

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima para o ano de 2015 cerca de 300.000 novos casos de leishmaniose visceral e com cerca de 20.000 mortes em humanos, sendo que 90% dos casos reportados e com risco de ocorrência estão concentrados em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO Leishmaniasis, 2015).

No Brasil, foram registrados entre os anos de 2003 a 2013, mais de 38 mil casos de leishmaniose visceral em humanos, com mais de 2.600 óbitos notificados conforme Figura 2 (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a; BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013b).



Figura 2 – Taxa de Incidência e número de óbitos notificados entre os anos de 2001 e 2013 de Leishmaniose visceral.

Fonte: Sinan. IBGE.

No mesmo período, na região Sudeste foram registrados 6.837 casos, sendo o estado de Minas Gerais responsável por 4.676 casos e 461 óbitos (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a; BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013b).

A leishmaniose visceral (LV) era, primariamente, uma zoonose de caráter eminentemente rural. Mais recentemente, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande portes e se tornou crescente problema de saúde pública no país e em outras áreas do continente americano, sendo uma endemia em franca expansão geográfica (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

2.5 LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA

A *Leishmania (L.) infantum chagasi* em humanos tem predileção pelas células do sistema retículo-endotelial no hospedeiro vertebrado, assim as formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e irão atingir órgãos como o baço, fígado, medula óssea, linfonodos, menos frequentemente rins, intestinos e pulmões.

O baço geralmente se encontra bastante aumentado, consistente, congesto, com focos hemorrágicos, cápsula fibrosa e espessada, e as amastigotas podem ser visualizadas no interior dos macrófagos. O fígado geralmente aumentado de volume, principalmente após na fase inicial da doença, apresentando degeneração gordurosa, reações inflamatórias intensas atingindo o sistema porta, que com a progressão da doença ocorrem atrofia e degenerações nas células parasitadas e nos hepatócitos (COURA, 2005b; REY, 2001a).

Na medula óssea ocorrem sinais de hiperplasia funcional, com poucas células gordurosas e sua atividade hematopoiética comprometida. No interior dos macrófagos são encontradas várias amastigotas, no entanto em menor quantidade que no baço. Linfonodos podem apresentar aumento especialmente na fase crônica da doença. Nos rins, pode-se encontrar nefrite intersticial, glomerulonefrite e deposição de imunocomplexos. No intestino os parasitos são raramente encontrados, mas quando presentes estão presentes nas células reticulares dos folículos linfoides ou vilosidades, podendo estar na mucosa do intestino delgado em infiltrados inflamatórios com macrófagos contendo os parasitos, desencadeando um quadro diarreico nos pacientes. Em pulmões podem ser observados raros casos de pneumonite intersticial e broncopneumonia de origem hipostática (COURA, 2005b; REY, 2001a).

A leishmaniose visceral tem período de incubação variável de dias, meses ou anos, com tendência a se estender com a idade, mas principalmente relacionado à imunidade do paciente. Geralmente a primeira manifestação é a febre prolongada e irregular, instalação do quadro de hepatoesplenomegalia, com distensão abdominal de aspecto duro e volumoso, e a presença de anemia. Com a evolução da doença o emagrecimento e a palidez se tornam evidentes, assim como a intensa distensão do abdômen (COURA, 2005b; REY, 2001a).

Após o estabelecimento da doença, quando não realizado o tratamento, irá ocorrer a morte na maioria dos pacientes. Segundo a Organização Mundial de Saúde existem cerca de 35 milhões de pessoas infectadas com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) no mundo, na América Latina existem cerca de 1,5 milhões, sendo que muitas dessas pessoas vivem em áreas que são endêmicas para a Leishmaniose Visceral (“WHO | HIV/AIDS”, 2015).

O crescente número de casos de pacientes com HIV em áreas endêmicas para LV aumenta o risco de desenvolvimento da doença. No Brasil o maior número de casos de coinfeção LV-HIV está concentrado na região Nordeste. Quando um

paciente HIV positivo se infecta com LV, provavelmente irá desenvolver todo o quadro clínico da doença e irá necessitar de um acompanhamento médico frequente, uma vez que a evolução clínica da LV depende da resposta imunológica do paciente, que por estar comprometida, acelera a evolução dos sintomas (LINDOSO et al., 2014).

2.6 RESERVATÓRIOS

A manutenção de *Leishmania* spp depende principalmente do ciclo zoonótico, sendo que o cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório urbano de *Leishmania* spp, pois apresenta intenso parasitismo cutâneo, estreito contato com o homem e principalmente por servir de fonte de alimento, atraindo a presença do vetor, que frente às condições ambientais como temperatura, umidade e presença de matéria orgânica tem condições de se perpetuar facilitando a transmissão para outros animais e para o homem (CAMARGO-NEVES et al., 2006).

As altas prevalências de infecção em reservatórios caninos foram relatadas em áreas de ocupação recente, caracterizadas por habitações com condições sanitárias precárias e adjacentes à floresta em que há geralmente uma abundância de vetores e reservatórios que podem contribuir para a manutenção e disseminação da LV (BARBOSA et al., 2014).

As manifestações clínicas da doença no cão são inespecíficas, mimetizando várias outras enfermidades. Solano-Gallego et al. (2011) estabeleceram classificações para quatro diferentes estágios da doença no cão de acordo com sinais clínicos, diagnóstico sorológico e perfis laboratoriais. Para o estágio I que compreende a doença leve, animais com sorologia negativa ou com baixos títulos de anticorpos; poucos sinais clínicos como linfadenomegalia periférica ou presença de dermatites papulares; normalmente nenhuma anormalidade clinicopatológica observada e perfil renal dentro dos parâmetros normais. No estágio II, classificado como doença moderada, com sorologia positiva e anticorpos variando entre baixos ou altos títulos; além dos sinais do estágio I, os cães podem apresentar lesões cutâneas simétricas ou difusas com dermatites esfoliativas, onicogribose; ulcerações em plano nasal, coxins, proeminências ósseas e em junções mucocutâneas; anorexia, perda de peso, febre e epistaxe; anormalidades clinicopatológicas como discreta anemia não

regenerativa, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome de hiperviscosidade sérica, quando perfil renal se encontra dentro da normalidade (creatinina < 1,4mg/dl) a relação proteína/creatinina urinária (UPC) < 0,5 ou também pode variar de 0,5-1. No estágio III, doença severa, os animais podem apresentar além dos sinais dos estágios I e II, outros sinais originários da formação e deposição de imunocomplexos, lesões vasculares, artrite, uveíte e glomerulonefrite; além das anormalidades clinicopatológicas do estágio II, doença renal crônica, relação proteína/creatinina urinária (UPC) > 1, creatinina podendo variar entre 1,4-2mg/dl. Já para o estágio IV, doença muito severa, níveis de anticorpos na sorologia de médio a altos títulos; além dos estágios clínicos anteriores, pode ocorrer tromboembolismo pulmonar, síndrome nefrótica e doença renal em estágio terminal, sendo as alterações em perfil renal com creatinina variando $2 \geq 5$ mg/dl e $UPC > 5$ (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Outra classificação proposta por Paltrinieri et al. (2010) em quatro estágios com presença de outros parâmetros. Para o estágio A, são considerados cães expostos; ocorre normalmente em regiões com a presença de vetores para *Leishmania*, e os cães são negativos em testes de citologia, histologia, diagnóstico parasitológico e molecular, apresentando apenas baixos títulos de anticorpos em sorologia; geralmente são animais clinicamente saudáveis ou apresentam algum sinal clínico decorrente da associação com outras doenças. No estágio B, considerados cães infectados, com diagnóstico confirmado através de métodos diretos como técnicas de microscopia, ou cultura celular do microrganismo ou por ensaios de PCR; cães apresentam baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*; podem estar saudáveis ou apresentar sinais clínicos ou patológicos associados a outras doenças. Em áreas endêmicas, o encontro de resultados positivos de PCR de material de pele ou sangue na ausência de lesões ou que foi colhido durante o período de infecção pode não ser suficiente para classificar o cão como infectado.

Para o estágio C, cães doentes, que apresentam sinais clínicos evidentes de leishmaniose, compreendem cães com citologia positiva, altos títulos de anticorpos e diversas manifestações clínicas como caquexia, hipotrofia muscular, letargia, palidez de mucosa, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, febre, claudicação com edema de membros, epistaxe, dermatites localizadas ou difusas com presença de ulcerações cutâneas e/ou mucocutâneas, alterações oculares e possibilidade de comprometimento de trato gastrointestinal e neurológico. Na ausência de sinais clínicos associados com a infecção, devem ser realizadas perfis hematológicos,

bioquímicos e alterações urinárias sugestivas para a leishmaniose. Para o estágio D, cães severamente doentes, estão incluídos aqueles em condições clínicas severas com evidencia de nefropatia proteinúrica ou falência renal crônica; presença de doenças oculares, perda de peso severo, doenças articulares impedindo a movimentação do animal, condições de coinfeções, alterações endócrinas, metabólicas e imunes que podem ou não estar relacionadas com a infecção por *Leishmania* (PALTRINIERI et al., 2010).

Amusatogui et al., 2003 analisando cães com LVC em comparação de idade, raça e presença de sinais clínicos, encontrou que fêmeas apresentam maiores títulos de anticorpos e possuem baixa concentração de albumina sérica comparado aos machos. Cães mais jovens geralmente são assintomáticos. Não encontrou predisposição racial, nem distinção entre os sexos de maior predominância da doença, sendo que a maior incidência da LV depende da maior exposição do animal ao vetor. Sugere ainda que os títulos de anticorpos mais elevados se relaciona a presença de sinais clínicos e adultos são os mais afetados pela doença.

A pele de cães infectados é um reservatório de parasitos, sendo que cães assintomáticos podem apresentar formas amastigotas na pele, o que pode representa um importante papel na transmissão para os flebotomíneos, conseqüentemente foco para outros cães e humanos. Outro aspecto importante é o intenso deslocamento de indivíduos com os seus animais de estimação, contribuindo para a disseminação da doença para regiões não endêmicas (FORATINNI, 1992). No entanto, animais silvestres como as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris* e *D. marsupialis*), possuem papel importante na transmissão em áreas rurais (LAINSON, 1983).

2.7 PRINCIPAIS VETORES

O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da LVC nas Américas, é um inseto de 2 a 3 mm de comprimento bem adaptado ao ambiente peridomiciliar e distribuído por toda a América Latina (BOELAERT; ROMERO, 2010).

São pequenos insetos dípteros, muito pilosos, de cor-de-palha ou castanho-claros, que tem o hábito de pousar com as asas entreabertas e ligeiramente

levantadas. Possuem as antenas longas e com muitos segmentos e pertencem à família Psychodidae, que se caracteriza pelas asas em forma lanceolada revestidas com muitas cerdas longas; possuindo ainda nove ou mais veias atingindo a margem da asa e presença de nervuras transversais em sua metade basal, caracterizando a subfamília Phlebotominae (REY, 2001b).

Os flebotomíneos tem a cabeça pequena, alongada, fletida para baixo. Seu aparelho bucal é do tipo picador-sugador com um par de mandíbulas, um par de maxilas, lábio inferior e palpos maxilares. Outros elementos morfológicos são as espermatecas nas fêmeas (apêndices do canal útero-vaginal) e a terminália do aparelho genital masculino (os gonóstilos, parâmetros e lobos laterais), algumas das estruturas utilizadas para a taxonomia dessas espécies. Somente as fêmeas adultas são hematófagas, podendo também se alimentar de sucos vegetais, como fazem os machos. A fecundação pode ocorrer antes ou após o repasto sanguíneo, estando esses em vôo ou pousados. No entanto é necessário ao menos um repasto sanguíneo após a fecundação para amadurecimento dos folículos. Cada fêmea põe de 40 a 70 ovos em locais úmidos e com presença de matéria orgânica. Os ovos medem cerca de 0,3 mm, são alongados e brancos no momento da postura, se tornando castanhos ou negros em seguida. O período de incubação varia de 6 a 17 dias e as larvas irão alimentar da matéria orgânica do solo ou do local escolhido para a postura; entre 15 a 70 dias formam-se as pupas, que se tornarão adultos em cerca de 1 a 2 semanas. O período completo de desenvolvimento varia de 1 a 3 meses, no entanto, os adultos tem vida média de apenas 2 a 4 semanas (REY, 2001b).

A atividade dos flebotomíneos é basicamente crepuscular ou noturna. Durante o dia permanecem em abrigos sombrios e úmidos, protegidos do vento, como em fendas de árvores, interior de instalações rurais ou habitações humanas, quando presentes no ambiente domiciliar e peridomicilar. Já no ambiente silvestre, em florestas e locais úmidos e sombrios, as fêmeas apresentam atividade diurna, alimentando-se de pequenos roedores e répteis. Deslocam-se com vôos curtos, percorrendo alguns metros. O vôo é silencioso, e as populações de flebotomíneos sofrem pequena variação em locais de clima quente e úmido, já em locais com variações climáticas bem marcadas a população decresce o número nos meses frios e secos. Em temperaturas inferiores a 20°C a atividade dos adultos e desenvolvimento das larvas se torna muito reduzido (REY, 2001b).

Surtos de leishmaniose visceral na região nordeste do Brasil, com infecção

canina e humana apresentou *Lu. longipalpis* como única espécie vetorial envolvida, sendo que essa população de insetos se encontra altamente adaptada às condições domiciliares e peridomiciliares e naturalmente infectada com *L. (L.) infantum chagasi*, indicando essa espécie como o principal vetor da LV. Outros aspectos que favorecem a presença do vetor são os constantes desmatamentos, especialmente em áreas de criação de novas estradas e rodovias em que a aglomeração de pessoas, bem como dos animais de estimação como cães, galinhas, entre outros animais muito próximos as áreas de florestas favorecem o repasto sanguíneo dos flebotomíneos, que rapidamente invadem as habitações humanas onde irão se manter por longos períodos de tempo (LAINSON; RANGEL, 2005).

Alguns autores levantam a hipótese de transmissão entre a população canina por meio de ectoparasitos, sugerindo a capacidade vetorial de pulgas e carrapatos (COLOMBO et al., 2011; SOLANO-GALLEGO et al., 2012), outros também indicam a transmissão através de transfusões sanguíneas entre os cães, inclusive em bancos de sangue (DE FREITAS et al., 2006; OWENS et al., 2001; TABAR et al., 2008), via transplacentária (BOGGIATTO et al., 2011; ROSYPAL et al., 2005) e transmissão venérea (SILVA et al., 2009b).

2.8 DIAGNÓSTICO

Vários métodos podem ser utilizados no diagnóstico da LVC, os principais são parasitológico, sorológico e molecular (MELO, 2004).

O diagnóstico parasitológico consiste na evidenciação do parasito, através da pesquisa de formas amastigotas intracelulares, em amostras biológicas, após coloração por métodos de Giemsa, de Leishman ou Panótico Rápido®. Quando há suspeitas de leishmaniose cutânea, as amostras são obtidas diretamente da lesão, por raspado de pele na borda da mesma, aspiração da borda inflamada ou biópsia. No caso de leishmaniose visceral, amostras são coletadas por punções aspirativas de baço, linfonodos, medula óssea ou crista ílica (FERREIRA; ÁVILA, 2001; REY, 2001c).

O diagnóstico de LVC é complexo, devido ao amplo espectro clínico e a gama de anormalidades em perfis bioquímicos, hematológicos e urinários não específicas.

Uma abordagem de diagnóstico clínico completo precisa ser adaptado para cada paciente, além disso, cães com leishmaniose podem ser coinfectados com outras doenças. A detecção de DNA de *Leishmania* em tecidos pelo PCR permite o diagnóstico sensível e específico da infecção. A PCR pode ser executada em DNA extraído de tecidos, sangue e fluidos corporais. Existem diferentes sensibilidades em relação aos tecidos e as técnicas utilizadas para a detecção de *L. infantum* por PCR. É importante salientar que informações fornecidas pela PCR não devem ser separadas dos dados obtidos de avaliações serológicas e clínicas. A variabilidade dos resultados dos métodos de diagnóstico variam conforme o estágio da doença, da resposta imune individual dos cães e presença de comorbidades, necessitando assim de diagnósticos diferenciais (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

A confirmação de LV pode ser feita pela demonstração direta do parasito em esfregaços ou cultivo do mesmo a partir de baço, fígado, medula óssea ou linfonodos. A sensibilidade da pesquisa direta em esfregaços em lâmina varia de 95 a 98% para o aspirado de baço (CHULAY; BRYCESON, 1983), 76 a 91% para o de fígado, 52 a 89% para o de medula-óssea (ZIJLSTRA et al., 1992) e 52 a 69% para o de linfonodos (SIDDIG et al., 1988; ZIJLSTRA et al., 1992). O cultivo dos parasitos aumenta a sensibilidade da pesquisa, mas atrasa o tempo de diagnóstico (GUERIN et al., 2002).

2.8.1 Métodos sorológicos

Antígenos recombinantes, espécie-específicos, como o K39 e K26 são utilizados em ensaios sorológicos e em testes imunocromatográficos no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral na África e Índia (SUNDAR et al., 1998). O antígeno K39 é uma proteína recombinante, de massa molecular 39kDa, localizada no DNA do cinetoplasto de *Leishmania*. A proteína rK39 apresenta sequência idêntica em sete espécies de *Leishmania*. A conservação de uma sequência de 39 aminoácidos repetitivos confere a esta proteína epítomos de alta densidade e identidade específica com as espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*. A reatividade com outros tripanossomatídeos mostrou-se negativa e a presença de anticorpos anti-rK39 indica a infecção ativa. O ELISA com o emprego do antígeno rK39, apresentou 100% de especificidade e 98% de sensibilidade na detecção de

anticorpos específicos no calazar na África (BADARÓ et al., 1996; BURNS et al., 1993; SUNDAR et al., 1998; ZIJLSTRA et al., 1998).

O gene k26 codifica uma proteína hidrófila de 247 aminoácidos, com 11 repetições de 14 aminoácidos, que correspondem a cerca de 64% de todas as proteínas. A proteína k26 possui uma massa molecular de 40kDa. A sequência de sua região conservada está presente em seis espécies de *Leishmania*. Não apresenta reatividade com espécies de leishmaniose tegumentar e *Trypanosoma cruzi* e é capaz de induzir uma alta resposta antigênica em indivíduos infectados (BHATIA et al., 1999).

O teste rápido imunocromatográfico DPP® (Bio-Manguinhos®) é um teste qualitativo para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza as proteínas recombinantes K39 e k26 como antígeno. Essas proteínas são obtidas a partir de um gene clonado de *L. (L.) infantum chagasi* e que contém uma repetição de aminoácidos conservados entre as espécies viscerotrópicas de *Leishmania* (*Leishmania donovani* e *L. (L.) infantum chagasi*) (BISUGO et al., 2007; BURNS et al., 1993).

O ELISA é um teste quantitativo para detectar anticorpos IgG e/ou IgM anti-*Leishmania*, apresenta maior sensibilidade e especificidade, principalmente quando se utilizam antígenos recombinantes como, por exemplo, o rK39. É realizado em placas e a titulação dos anticorpos é realizada por leitura de densidades ópticas através de espectrofotômetros. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é utilizada no diagnóstico das leishmanioses. São utilizadas formas promastigotas fixadas em lâminas como antígenos, incubadas juntamente com os soros de pacientes e a leitura é realizada através da interação dos anticorpos pela emissão de fluorescência. Tanto o ELISA quanto a RIFI podem apresentar reações cruzadas em soros de pacientes humanos com Doença de Chagas, hanseníase, tuberculose entre outros; já para os cães podem apresentar reatividade cruzada com *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*. (FERREIRA; ÁVILA, 2001; ZANETTE et al., 2014).

O Ministério da Saúde até o ano de 2011 recomendava duas técnicas sorológicas para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos, o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e a RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta). O ELISA recomendado para a triagem sorológica de cães e a RIFI para a confirmação dos cães sororreagentes ou indeterminados ao teste de ELISA. Resultados de avaliações realizadas pela Funed/MG demonstraram que todos os lotes de ELISA liberados para o uso na rede pública, em 2011, tiveram sensibilidade

e especificidade média acima de 95%. Já a RIFI (titulação > 1:80) demonstrou sensibilidade acima de 98,3% e especificidade acima de 94,1% (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Utilizam-se com menor frequência outros testes sorológicos como o Western-Blotting (WB), que reconhece frações antigênicas específicas do parasito (BERRAHAL et al., 1996), o DOT-ELISA, a imunodifusão, a imunomigração rápida e o teste de aglutinação direta para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (FAYET, 1999). Os testes sorológicos são relativamente sensíveis, porém pouco específicos, tanto pela presença de reações cruzadas com antígenos de outros tripanosomatídeos, como por não serem capazes de distinguir a espécie de *Leishmania*, nem tampouco diferenciar entre infecção ativa ou anterior (GRIMALDI; TESH, 1993).

A baixa especificidade é uma desvantagem comum aos métodos que utilizam antígenos não purificados ou recombinantes. Para tentar contornar esse problema, alguns antígenos purificados sintéticos ou recombinantes têm sido identificados (BURNS et al., 1993).

Para melhorar a qualidade do diagnóstico laboratorial da LV, para o Programa de Controle dessa endemia, o Ministério da Saúde em parceria com Fiocruz/RJ, Fundação Ezequiel Dias/MG, Instituto Adolfo Lutz/ SP, Laboratório do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande/MS, Grupo Técnico das Leishmanioses/MS e Coordenação de Laboratórios/MS propôs um novo protocolo a partir do ano de 2011, no qual o teste rápido imunocromatográfico DPP® (Bio-Manguinhos®) passa a ser utilizado como método de triagem e o teste ELISA (Bio-Manguinhos®) como confirmatório, em substituição ao protocolo no qual o Elisa era utilizado como método de triagem e a RIFI, como confirmatório. Estabeleceu-se ainda que o teste rápido deveria ser feito com amostras de sangue total, soro ou plasma, e o ELISA com soro de punção venosa, não permitindo mais o uso de amostras de sangue coletadas em papel filtro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

2.8.2 Métodos moleculares

A partir da década de 1980, iniciou-se o estudo de várias metodologias de diagnóstico baseadas nos princípios da biologia molecular, que permitem a

identificação do Gênero *Leishmania*, através de técnicas de hibridização e de amplificação de ácidos nucleicos, para detecção de RNA e de DNA (DOURADO, 2007). O diagnóstico molecular tem sido amplamente utilizado no diagnóstico de algumas doenças. A sensibilidade diagnóstica desses métodos depende da escolha adequada da sequência alvo e do objetivo do estudo (MARY et al., 2004).

O método de PCR (reação em cadeia da polimerase) através do qual é possível identificar e amplificar seletivamente o DNA do parasito constitui-se em uma nova perspectiva para o diagnóstico da leishmaniose visceral, pois apresenta sensibilidade e especificidade muito elevadas, próximas a 100% (BANETH, 2006; NOLI, 1999).

Com o avanço da PCR houve um aumento na sensibilidade de detecção, existem vários alvos para o Gênero *Leishmania* é baseado na identificação de sequencias conservadas do DNA são escolhidos e desenhados os primers para tais regiões alvo (TYLER, 2008).

As espécies de *Leishmania* tem de 20 a 25 cromossomos com alto grau de polimorfismo. A composição do DNA genômico é de 25% de sequências repetitivas, 13% por sequências moderadamente repetitivas e 60% por sequências únicas (LAINSON; SHAW, 1998). Diferentes sequências do DNA genômico de *Leishmania* tem sido utilizado em estudos, e o nível de variação inter e intraespécies tem sido considerado, assim variados alvos como região ITS, sequencias teloméricas, gp63, 18s ribossomal, SSU-rRNA, citocromo B (cyt b) e regiões variáveis e conservadas do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) tem sido usado para a taxonomia dessa espécie. Sendo realizado a partir de variadas amostras: sangue, aspirados de baço, de medula óssea, de linfonodos, pele entre outros (ASATO et al., 2009; TYLER, 2008).

2.9 REAÇÕES CRUZADAS

Cães são naturalmente infectados por uma variedade de parasitos. Os testes preconizados pelo Ministério da Saúde em inquéritos sorológicos caninos, DPP®, ELISA e RIFI podem apresentar reações cruzadas com outros grupos de parasitos, isso se dá devido à similaridade filogenética entre *Leishmania* e outros tripanosomatídeos como *Trypanosoma cruzi* (TRONCARELLI et al., 2009), *Trypanosoma caninum* (ALVES et al., 2012; MADEIRA et al., 2014), *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, ou entre diferentes microrganismos como *Rickettsia spp.*,

Ehrlichia canis, *Babesia canis*, (PAULAN et al., 2013; ZANETTE et al., 2014) entre outros, além da possibilidade de reação cruzada com espécies causadoras das formas tegumentares de leishmaniose (SILVA et al., 2011).

3 JUSTIFICATIVA

Em geral, os programas oficiais de vigilância e controle de LVC preconizam a realização de inquéritos sorológicos caninos visando conhecer a situação epidemiológica da doença nas áreas com transmissão ativa ou com potencial de transmissão e simultaneamente à identificação dos cães sorologicamente positivos (CAMARGO-NEVES et al., 2006).

A LV tem apresentado nos últimos anos a ocorrência cíclica de surtos a cada período médio de cinco anos, e uma tendência crescente de sua incidência e de ampliação da área de ocorrência. As razões desse comportamento não se encontram completamente esclarecidas, mas os processos migratórios e a urbanização, com a invasão de áreas anteriormente silvestres têm sido apontados como principais fatores. A ausência de estratégias eficazes tem representado um obstáculo ao controle da doença (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Taxas de mortalidade elevada em áreas não endêmicas, podem ser explicadas pela introdução de LV em novas áreas geográficas, a falta de acessibilidade aos serviços de saúde, atraso do diagnóstico, tratamento inadequado, manejo clínico incorreto de pacientes, a toxicidade de drogas, comorbidades associadas e fatores do hospedeiro (idades extremas, má nutrição e imunossupressão). Em áreas endêmicas, o aumento da mortalidade pode ser resultado de uma ocorrência de LV em populações vulneráveis como os pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (COSTA et al., 2010; DE ARAÚJO et al., 2012; MADALOSSO et al., 2012)

O Ministério da Saúde preconiza para o controle de LV: o controle da população canina errante; uso de telas em canis individuais ou coletivos; uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4%; redução da população de flebotomíneos e eliminação dos reservatórios domésticos (BRASIL, 2014).

Especificamente, a cidade de Alfenas possui uma população flutuante de estudantes de diversas partes do país, inclusive de áreas endêmicas para leishmaniose, por esse motivo existe a possibilidade de introdução de animais positivos assintomáticos dessas regiões para o município.

Harmonizando os objetivos da investigação com os preceitos da promoção da saúde baseada em ações preventivas com foco na atenção primária, preconizadas pelo SUS, busca-se inserir nesse projeto integrações com a Secretaria Regional de

Saúde, Prefeitura Municipal e clínicas veterinárias, possibilitando a elaboração conjunta das ações de pesquisa e criação de prováveis medidas de controle epidemiológico da LV no município.

A região do sul de Minas Gerais possui um grande número de plantações de café tanto em áreas rurais quanto próximas ao ambiente urbano, chegando muitas vezes ao peridomicílio. Inquéritos sorológicos de casos de leishmaniose canina e de flebotomíneos tem sido realizado na região, com achados de exemplares de flebotomíneos envolvidos na transmissão de LTA em plantações de café (ALEXANDER et al., 2002), alguns exemplares de *Lu. longipalpis* (LOIOLA; SILVA; GALATI, 2007), caso canino positivo no ano de 1999 e presença de várias espécies de flebotomíneos (SILVA; SANTA ROSA, 2005; SILVA et al., 2008); outro mais recente em uma área com presença de galinhas encontrando exemplares de *Lu longipalpis* e de cães infectados no mesmo ambiente (BARÇANTE et al., 2015).

Desta forma o presente trabalho tem como objetivo avaliar a ocorrência de leishmaniose visceral canina em cães provenientes do canil municipal e clínicas veterinárias do município de Alfenas –MG por meio de métodos sorológicos e moleculares. A presente investigação contribuirá com os preceitos da promoção da saúde baseada em ações preventivas com foco na atenção primária, preconizadas pelo SUS, buscando inserir nesse projeto integrações com a Secretaria Regional de Saúde, Prefeitura Municipal e clínicas veterinárias, possibilitando a elaboração conjunta das ações de pesquisa e criação de prováveis medidas de controle epidemiológico da LV no município.

4 OBJETIVOS

Abaixo serão descritos os objetivos gerais e específicos.

4.1 GERAL

Este trabalho propõe avaliar a ocorrência de leishmaniose visceral canina em cães provenientes do canil municipal e clínicas veterinárias do município de Alfenas –MG por meio de métodos sorológicos e moleculares.

4.2 ESPECÍFICOS

- a) Realizar os ensaios imunológicos: teste rápido imunocromatográfico DPP® Bio-Manguinhos, ELISA *in house* e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) *in house*, nas amostras de soro;
- b) Realizar a PCR convencional e em tempo real nas amostras de sangue total e de fragmentos de baço e fígado dos animais;
- c) Realizar o diagnóstico parasitológico nas amostras de baço dos animais necropsiados;
- d) Realizar o sequenciamento de DNA nas amostras positivas em testes moleculares para Leishmaniose Visceral Canina;
- e) Realizar a RIFI e PCR Convencional para outros parasitos, para avaliar a possibilidade de reatividade cruzada.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido em parceria com a Prefeitura Municipal de Alfenas (Setor de Zoonoses/Departamento de Vigilância Epidemiológica e Sanitária da Secretaria Municipal de Saúde), através da disponibilização do uso do canil bem como permitir a avaliação e coleta de material dos cães. Com a colaboração do Instituto Adolfo Lutz Rio Claro – SP, através de treinamento de técnicas sorológicas para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina. Do Laboratório de Patologia das Moléstias Infecciosas (LIM-50) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) – com a disponibilização de kits e materiais para os testes sorológicos de LVC, bem como disponibilização do laboratório para a realização da RIFI e ELISA *in house*, e teste rápido imunocromatográfico DPP® Bio-Manguinhos nas amostras de soro. Do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP através do treinamento e disponibilização das dependências dos laboratórios para a realização da RIFI para *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Rickettsia sp* e PCR Convencional para *Trypanosoma cruzi*, gene citocromo B de tripanosomatídeos e para o gene quitinase. No Laboratório de Biologia Molecular de microrganismos da Universidade de Alfenas onde foram realizadas as reações de PCR convencional e em Tempo Real para LVC.

5.1 AMOSTRAS

As amostras foram provenientes de cães residentes no Canil Municipal (64 animais – amostras de 1 a 64) e de clínicas veterinárias do município (23 animais – amostras de 65 a 84 e 89 a 91) e duas amostras de baço e duas amostras de fígado dos animais que apresentaram resultados positivos para LVC e foram submetidos à eutanásia (amostras 85 a 88). Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA – Unifal- MG registro nº 507/2013 (Anexo).

5.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

Todos os animais foram examinados para a percepção de sinais clínicos sugestivos de leishmaniose visceral. Os principais sinais clínicos avaliados foram: alopecia, epistaxe, ulceração/descamação cutânea (especialmente na ponta das orelhas e focinho), conjuntivite, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, onicogribose, edema de membros e emagrecimento. Tais sintomas foram incluídos em duas categorias: presente ou ausente.

5.3 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Para a coleta do material biológico o animal foi contido com o auxílio de focinheira. Pelo menos 4mL de sangue venoso foram coletados por meio de punção da veia cefálica, jugular ou braquial utilizando-se seringas e agulhas descartáveis. Imediatamente após a coleta, 2mL do sangue foram transferidos para tubos a vácuo contendo EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético; Greiner Bio One-Brasil) enquanto 2mL transferidos para tubos secos (Greiner Bio One) para obtenção de soro. Todas as amostras foram transferidas para o Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Federal de Alfenas sob condições adequadas de refrigeração.

5.4 DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL NOS CÃES AMOSTRADOS

O diagnóstico da infecção natural por *L. (L.) infantum chagasi* em cães oriundos do município de Alfenas foi realizada por meio de métodos sorológicos e moleculares: a) ELISA para detecção de imunoglobulinas IgG anti-*Leishmania (L.) infantum chagasi*, b) método rápido imunocromatográfico DPP® Bio-Manguinhos, c) Reação de Imunofluorescência Indireta, d) método molecular PCR convencional e Tempo Real (qPCR) para detecção de DNA de *Leishmania*.

5.4.1 Diagnóstico sorológico

A seguir serão descritos os métodos sorológicos de diagnóstico de LVC.

5.4.1.1 Protocolo do Teste Rápido Imunocromatográfico DPP® Bio-Manguinhos

O teste DPP® foi realizado conforme protocolo do fabricante do kit. Pela adição de 5µL de sangue total ou soro ao poço 1 intitulado “Amostra + Tampão”, seguido da adição de 1 gota do tampão, aguardando-se 5 minutos, para observar o desaparecimento das duas linhas verde e azul, e adicionando-se então 4 gotas do tampão no poço 2 intitulado “Tampão”. A leitura dos resultados foi realizada 10 minutos após esta etapa. Quando o resultado for negativo: aparecimento de uma linha vermelha na região C (Controle) ou positivo: aparecimento de duas linhas vermelhas C e T (Teste).

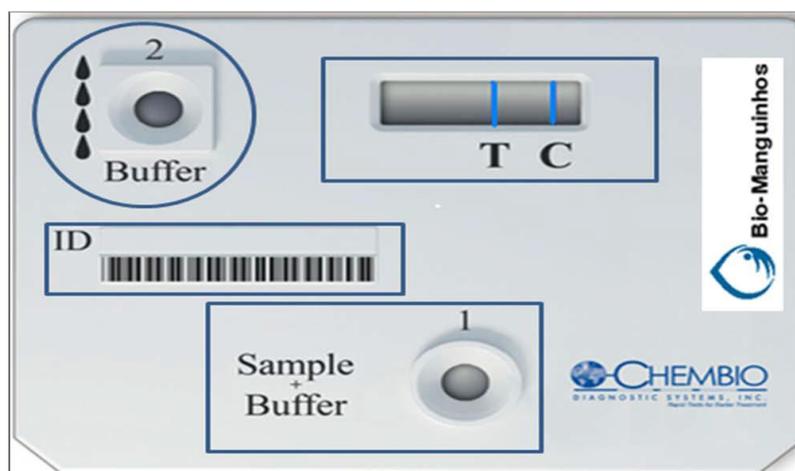


Figura 3 - Teste rápido imunocromatográfico Dual Path Platform (DPP®)

5.4.1.2 ELISA

O teste de ELISA foi executado conforme técnica descrita por (VOLLER; BARTLETT; BIDWELL, 1978), com algumas modificações (COLOMBO et al., 2011). A placa de poliestireno (fundo chato) foi sensibilizada com 10µL de antígeno solúvel de

L. (L.) infantum chagasi na concentração 10µg/well, diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,5 no volume de 100 µL/poço. A placa foi vedada e armazenada em geladeira por uma noite. Em seguida a solução antigênica foi desprezada, a placa lavada em lavadora automática de placas por três vezes com solução de lavagem (PBS Tween: 0,05%: 500mL PBS; 250 µL Tween – 0,05%). Em seguida bloquearam-se os sítios inespecíficos com 150µL por poço de tampão de bloqueio (solução a 10% de leite em pó Molico-Nestlé em PBS), incubando-se a placa em câmara úmida a 37°C por 2 horas. Após novo procedimento de lavagem, por três vezes com solução de lavagem, as amostras de soro, diluídas a 1:400 em Solução PBS Tween 0,05%, foram distribuídas 100 µL/poço. Após incubação a 37°C por uma hora, a placa foi retirada da estufa e repetido o procedimento de lavagem. A seguir o conjugado anti-IgG de cão com fosfatase alcalina (A40-123AP - Bethyl), diluído 1/2000, foi distribuído no volume de 100µL/poço. Após incubação a 37°C por 45 minutos, a placa foi retirada da estufa, e realizado o procedimento de lavagem. Para a revelação, foi acrescentado 100µL/poço de substrato pNPP 1mg/mL em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,5 (N9389 – Sigma) e mantido por 30 minutos a 37°C em ambiente ausente de luz. A paralização da reação foi realizada com Solução de hidróxido de sódio 2N, no volume 50µL/poço e leitura realizada em espectrofotômetro, em filtro de 405 nm. Os valores de absorbância observados foram corrigidos, subtraindo-se o valor da absorbância do branco. Para o estabelecimento da linha de corte (cut-off) a média dos valores de absorbância obtidos para os soros controle negativos foi somada a duas vezes o seu desvio-padrão. Assim, as amostras com valores de absorbâncias menores que o valor do cut-off, foram consideradas negativas, e amostras com valores acima do valor do cut-off foram consideradas positivas.

5.4.1.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Abaixo segue a descrição da produção do antígeno e protocolo da RIFI.

5.4.1.3.1 Produção do antígeno

Foi realizada de acordo com Silva et al. (2009), sendo que as formas

promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, cepa MHOM/BR/72/cepa 46, foram isoladas em meio de cultura Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2% de urina humana, 10µg/mL de gentamicina e 100UI/mL de penicilina, a partir de baço de hamster cronicamente infectado. Após duas a três passagens em cultura, as formas promastigotas em fase estacionária de cultivo foram lavadas três vezes em solução salina tamponada (PBS) estéril, através de centrifugação a 3.000 rpm (1006g) à 4°C. O precipitado no fundo do tubo foi ressuspenso em solução de formalina tamponada 2% e mantido a 4°C por 24 horas. Após a fixação das formas promastigotas, essas foram novamente lavadas em solução salina tamponada e realizada a contagem em câmara de Neubauer. A concentração de parasitos foi ajustada para 2×10^6 promastigotas/mL e foram aplicados 20µL por poço nas lâminas de imunofluorescência, em seguida deixadas secar naturalmente em temperatura ambiente. As lâminas secas foram embrulhadas em papel vegetal e acondicionadas em papel alumínio e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

5.4.1.3.2 Protocolo da RIFI

O protocolo foi realizado conforme descrito previamente (NARDO et al., 2011). As lâminas com antígeno contendo as promastigotas foram retiradas do freezer e mantidas em temperatura ambiente. Os soros foram diluídos nas concentrações 1:40 e 1:80 para cada animal juntamente com os controles positivos e negativos previamente estabelecidos e colocados nas lâminas em um volume de 15µl. A seguir, foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida a 37°C e, posteriormente, lavadas com PBS pH 7,2 três vezes durante 5 minutos. As lâminas foram secas delicadamente, e sobre os orifícios foram adicionados 15µl de anticorpo anti-IgG de cão, marcado com fluoresceína, diluído 1:100 em 0,004% Azul de Evans em PBS pH 7,2. Após nova incubação em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, as lâminas foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS pH 7,2. A seguir receberam uma fina camada de glicerina tamponada e foram cobertas com lamínulas. As leituras foram feitas em microscópio de fluorescência, marca Olympus®, em aumento de 400 vezes. Neste método, consideraram-se positivas as reações fluorescentes em soros com

diluições iguais ou superiores a 1:80.

5.4.2 Diagnóstico molecular

Abaixo serão descritas as reações em cadeia de polimerase.

5.4.2.1 PCR Convencional

Seguem abaixo as descrições dos protocolos de extração e amplificação da PCR convencional.

5.4.2.1.1 Extração de DNA em amostra de sangue

Todas as amostras de sangue dos cães foram processadas conforme protocolo básico de extração de DNA descrito por Sambrook et al. (1989) e com as modificações descritas previamente (GOMES et al., 2007). As amostras coletadas com EDTA foram centrifugadas para a retirada do plasma. A papa de hemácias foi adicionado um tampão de lise (ACK), e mantido sob agitação até a completa lise das hemácias. O tubo foi então centrifugado e o sobrenadante desprezado, e ao precipitado foi adicionado um tampão de lise contendo Proteinase K seguido de incubação em banho-maria a 56°C, até a lise completa das células nucleadas. O DNA foi extraído pelo protocolo fenol/clorofórmio/isoamil e precipitado com isopropanol. O DNA precipitado foi lavado com etanol a 70% e centrifugado a 10.000 rpm (11.180g) por 10 minutos. O sedimento foi dissolvido em água pura. Todo material genético de DNA, foi dosado no Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e sua concentração corrigida para 250 ng/μl nas amostras.

5.4.2.1.2 Extração de DNA em amostra de tecido

Os cães n° 67 e 68 que apresentaram resultados positivos em sorologia e por PCR em tempo real foram submetidos à eutanásia e colhido material de baço e fígado para extração de DNA (a saber: amostra n° 85, fragmento de baço do cão n° 67; amostra n° 86, fragmento de fígado do cão n°67; amostra n° 87, fragmento de baço do cão n° 68 e amostra n°88, fragmento de fígado do cão n° 68). As amostras foram processadas conforme protocolo básico de extração de DNA descrito por Sambrook et al. (1989) e com as modificações descritas previamente (GOMES et al., 2007). As amostras foram maceradas, a seguir foi adicionado um tampão de lise (ACK), e mantido sob temperatura de 56°C até a completa lise do material. O DNA foi extraído pelo protocolo fenol/clorofórmio/isoamil e precipitado com isopropanol. O DNA precipitado foi lavado com etanol a 70% e centrifugado a 10.000 rpm (11.180g) por 10 minutos. O sedimento foi dissolvido em água pura. Todo material genético de DNA, foi dosado no Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e sua concentração corrigida para 250 ng/μl nas amostras.

5.4.2.1.3 Amplificação

As amplificações foram realizadas utilizando um kit comercial (*GoTaq®Green Master Mix - Promega*) contendo 2 corantes (azul e amarelo) que permitem monitorar o progresso das amostras durante a eletroforese. Cada 12,5 μl do “mix” contém 1 unidade de Taq DNA polimerase em 10mM Tris-HCl, pH 8.5; 50mM KCl; 1.5 mM MgCl₂ e 200 mM de cada um dos desoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Cada reação foi realizada adicionando-se 3μl do DNA alvo e 50pmol de cada marcador molecular em um volume final de 25 μl. As amplificações foram realizadas utilizando um termociclador (*GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems*).

Foram adotadas medidas de controle em todas as etapas da reação. A cada conjunto de reações foram adicionados um controle negativo, contendo apenas água pura e um controle positivo, extraído de cultura de promastigotas de cepa padrão de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/LD/strain 46).

A detecção do DNA de *Leishmania* nos cães foi realizado com o par de iniciadores: RV1/RV2 (5'CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G3' e 5'CCA CCT GGC CTA TTT TAC ACC A3'), marcador molecular que identifica *L. (L.) infantum chagasi* e amplifica um fragmento de 145pb de uma região variável do minicírculo do kDNA (região LT1), específica para o complexo *L (L) donovani* (GOMES et al., 2007; LE FICHOUX et al., 1999; RAVEL et al., 1995). As amplificações foram constituídas de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos. A segunda etapa foi composta de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (60°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 30 segundos) repetida por 30 ciclos. A última etapa constituiu de um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. O par de marcadores GAPDH-4 (5'AGG CTG AGA ACG GGA AAC TT3' e 5'ATT AAG TTG GGG CAG GGA CT3'), foi utilizado como controle de extração, visto que amplifica um fragmento de 911pb da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase canina (KULLBERG et al., 2006). Este marcador foi utilizado para verificar a integridade do DNA canino extraído, e se caso houvesse algum agente inibidor de reação, o resultado desta PCR seria negativa. Esta reação foi realizada simultaneamente e com as mesmas condições do protocolo RV1/RV2.

5.4.2.2 PCR em Tempo Real

A seguir serão descritas as reações e iniciadores para a PCR em tempo real.

5.4.2.2.1 Linj31

Para a PCR em tempo real foram utilizados sondas de hidrólise do tipo TaqMan, duplamente marcadas. Na extremidade 5'-end foi ligado covalentemente um fluoróforo FAM (6-carboxy-fluorescein). Na extremidade 3'-end, foi ligado um "quencher" NFQ (non-fluorescent quencher). O marcador utilizado foi: Linj31F: 5'CCG CGT GCC TGT CG3'; Linj31R 5' CCC ACA CAA GCG GGA ACT3' e a sonda TaqMan 5'CCTCCTTGGACTTTGC3' que amplifica um fragmento de 140 bp correspondente a

uma proteína hipotética do mRNA de *L. (L.) infantum*. As reações foram realizadas em um ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), em um volume final de 20µL por reação. O volume de 3µL de DNA ou (amostras ou controles) foram adicionadas a um reagente contendo 10 µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix e 1µL de uma mistura que inclui os marcadores forward e o reverse na concentração de 18µM, e a sonda TaqMan, marcada com FAM e usando NFQ como quencher na concentração de 5µM. Foram adicionados às reações dois controles negativos e um controle positivo. As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos. A segunda etapa foi um ciclo a 95°C por 10 minutos. Na próxima etapa foram realizados 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto (COLOMBO et al., 2011).

5.4.2.2.2 *Ldon*

Para a identificação das espécies do Complexo *L. donovani*, foram utilizados os seguintes marcadores a partir da região da actina da espécie *L. (L.) infantum*: Ldon37ACTF, 3'AAG TGC GAC ATT GAT GTG CGC'5; Ldon114ACTR 3'AAG GTT GAG GAA CAT GGT CGA C'5 e a sonda de hidrólise TaqMan marcada com o fluoróforo HEX; Ldon66ACTPB, 5'CC GGA CAG CAC GAT GTT CCC GTA C3' que amplifica um fragmento de 78pb. As reações foram realizadas em um ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) em um volume final de 20µL por reação. O volume de 3µL de DNA (amostras ou controles) foi adicionado a um reagente contendo 10 µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix e 1µL de uma mistura que inclui os marcadores forward e o reverse na concentração de 18µM, e a sonda TaqMan, marcada com HEX e usando NFQ como quencher na concentração de 5µM. A cada ciclo de amplificação foram incluídos dois controles negativos e um controle positivo, ocorrendo em um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos. A segunda etapa constou de um ciclo a 95°C por 10 minutos. Na próxima etapa foram realizados 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto (COLOMBO, 2012).

5.4.2.2.3 *DNApol*

Foram utilizados os seguintes marcadores a partir da região do gene DNA polimerase de *L. (L.) infantum*: DNApolIF, 5'TGT CGCT TGC AGA CCA GATG-3'; DNApolR 5'GCA TCG CAG GTG TGA GCAC 3') e a sonda TaqMan marcada com o fluoróforo 5'FAM-CAGCAA CAACTTCGAGCCTGGCACC-3'TAMRA que amplifica um fragmento de 90bp. As reações foram realizadas em um ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) em um volume final de 20µL por reação. O volume de 3µL de DNA (amostras ou controles) foi adicionado a um reagente contendo 10 µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix e 1µL de uma mistura que inclui os marcadores forward e o reverse na concentração de 18µM, e a sonda TaqMan, marcada com FAM e usando NFQ como quencher na concentração de 5µM. A cada ciclo de amplificação foram incluídos dois controles negativos e um controle positivo, ocorrendo em um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos. A segunda etapa constou de um ciclo a 95°C por 10 minutos. Na próxima etapa foram realizados 50 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 65°C por 1 minuto (BRETAGNE et al., 2001).

5.4.3 Diagnóstico parasitológico

Os cães que apresentaram resultados positivos nos testes sorológicos (n° 67 e 68°) e por PCR em tempo real, foram submetidos a eutanásia e foram colhidos fragmentos de baço para a realização de um *imprinting*, impressões de fragmentos de tecido em lâminas de vidro, que após a secagem do material foram coradas através de Panótico Rápido®, de acordo com instruções do fabricante do kit, e observadas em microscópio óptico em aumento de 1000x. Foram pesquisadas formas amastigotas do parasito nas impressões coradas.

5.5 SEQUENCIAMENTO

As amostras que apresentaram material genético positivo para *Leishmania*, foram encaminhadas para o sequenciamento. Para as reações foram utilizados o par

de primers LGITSF2: 3'GCA TGC CAT ATT CTC AGT GTC5' e LGITSR2: 3' GGC CAA CGC GAA GTT GAA TTC5' com o tamanho do fragmento esperado de 418pb referente ao gene do ITS2 do Gênero *Leishmania*. O programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 8.1 foi utilizado para analisar e montar manualmente as sequências genéticas encontradas.

5.6 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS QUANTO A POSSÍVEIS REAÇÕES CRUZADAS

Para avaliação de possíveis reações cruzadas em sorologia com outros agentes as amostras dos cães foram submetidas à realização de outros testes, dentre eles a RIFI para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum*.

Foram utilizados como antígeno para *T. gondii*, taquizoítos (cepa RH) conforme descrito por Camargo (1974) e para *N. caninum* utilizou-se taquizoítos isolados de cultura (NC-1) (DUBEY et al., 1988) ambos fixados em lâminas. A titulação (cut-off) iniciou a 1:50 para *N. caninum* e 1:16 para *T. gondii*. Controles positivos e negativos foram adicionados em todas as reações e os soros que apresentassem positividade eram submetidos a várias diluições até se estabelecer a titulação máxima.

As amostras de soro foram também submetidas ao protocolo de RIFI utilizando isolados de cinco espécies de *Rickettsia*, *Rickettsia amblyommii* (cepa Ac37), *R. bellii* (cepa Mogi), *R. rhipicephali* (cepa Hj5), *R. parkeri* (cepa At24) e *R. rickettsii* (cepa Taiacu). Os antígenos foram fixados em lâminas de acordo com Horta et al. (2004). Amostras foram consideradas positivas com titulação superior a 1:64. Controles negativo e positivo foram adicionados em todas as lâminas para leitura e os soros que apresentassem positividade eram submetidos a várias diluições até se estabelecer a titulação máxima.

As amostras de DNA de 66 cães foram submetidas à realização de PCR utilizando o par de iniciadores 609F/706R, marcador que amplifica um fragmento de 900pb correspondente a sequência parcial do SSU rDNA (região V7/V8) conforme descrito por Da Silva et al. (2004), em algumas das amostras de DNA realizou-se PCR com o par de iniciadores P18/P20, que amplifica um fragmento de 880pb correspondente a sequência do gene citocromo B mitocondrial de *Trypanosoma cruzi*

conforme BRISSE et al., (2003) e submetido ao par de iniciadores chiF/chiR que amplifica o gene quitinase de 1000pb envolvido na interação entre flebotômíneo e parasito conforme Jamjoom et al. (2004).

5.7 INQUÉRITO DE FLEBOTOMÍNEOS

Foi realizado inquérito de flebotômíneos tanto no canil municipal quanto na propriedade onde residiam os dois cães de Paraguaçu que apresentaram resultados positivos para LVC.

As capturas foram realizadas das 18h às 6h, obedecendo-se os horários de crepúsculos vespertino e matutino, em Paraguaçu e no canil municipal de Alfenas, com as armadilhas automáticas luminosas, tipo CDC-modificadas (CDC-M), conforme Natal et al. (1991), por um dia em cada localidade. Em cada uma das localidades selecionadas, foram instaladas as armadilhas em diversos ecótopos, sem que nenhuma armadilha pudesse interferir na outra.

Em Paraguaçu as armadilhas foram distribuídas em ecótopos: 3 nos canis, 2 próximos ao cafezal, 2 em cômodos peridomiciliares onde os cães se abrigavam, 1 no domicílio próximo a cozinha, 1 no galinheiro e 1 no jardim externo. No canil as armadilhas foram distribuídas entre os canis dos animais.

Os espécimes capturados foram transportados para o Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL para triagem.

6 RESULTADOS

O diagnóstico de LVC nos cães do canil municipal e de clínicas veterinárias do município de Alfenas foi realizado pelos métodos sorológicos DPP[®], ELISA e RIFI, nas amostras de soro, e por métodos moleculares, PCR convencional e em Tempo Real, em sangue total e amostras de necropsia de fígado e baço.

Os animais do canil municipal não apresentaram sintomas compatíveis com o diagnóstico de leishmaniose visceral canina, mas seis cães se apresentaram positivos no teste rápido.

Do total de 23 cães atendidas em clínicas veterinárias em Alfenas, dois (nº 67 e 68) eram procedentes de outro município (Paraguaçu/MG, cerca de 24Km de distância). Esses dois animais apresentaram-se sintomáticos para LVC com sinais de onicogribose, descamação cutânea, conjuntivite, hiperqueratinização, linfadenopatia generalizada, alopecia periorcular, em extremidade de orelhas e cauda, dificuldade de deambulação com presença de poliartrite e esplenomegalia. Ambos foram positivos em testes sorológicos para LVC.

Todos os animais deste estudo, com exceção de dois cães (nº 67 e 68, 4,6%), não apresentaram sinais e sintomas compatíveis para LVC. Os dois cães com sintomatologia característica foram procedentes de Paraguaçu/MG e apresentaram onicogribose, descamação cutânea, conjuntivite, hiperqueratinização, linfadenopatia generalizada, alopecia periorcular, em extremidade de orelhas e cauda, dificuldade de deambulação, com presença de poliartrite e esplenomegalia.



Figura 4 - Cães nº67 e 68 sintomáticos para LVC.
Fonte: Da autora.

6.1 TESTE RÁPIDO IMUNOCROMATOGRÁFICO DPP® BIO-MANGUINHOS

Os resultados obtidos com o teste rápido DPP® revelaram que das 87 amostras de soro analisadas, oito (9,0%) amostras (n° 24, 26, 39, 44, 48, 56, 67 e 68) foram reagentes no teste (Tabela 1). Na Figura 5 estão apresentados os resultados observados em dois dos animais.

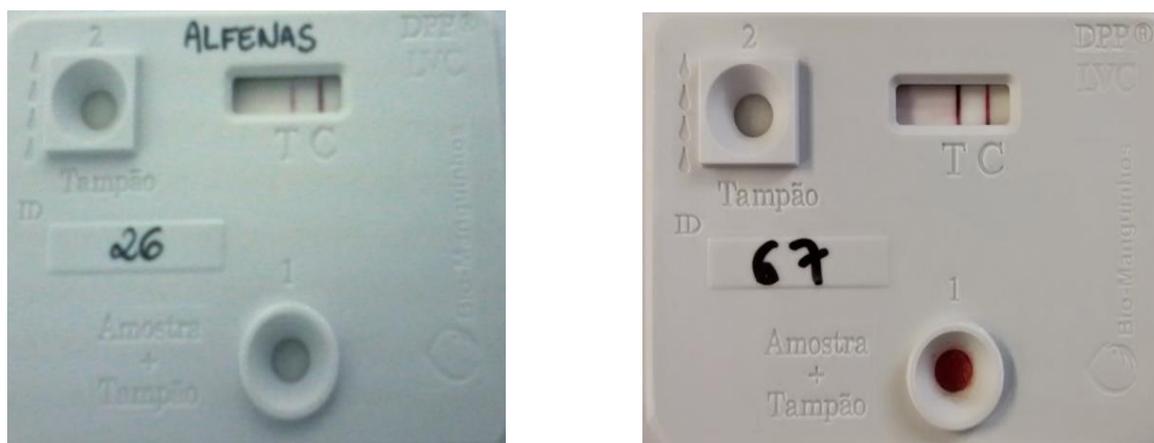


Figura 5 - Amostra de cão positiva em teste rápido DPP®, com presença de banda no teste (T) e no controle (C) (26 e 67).

Fonte: Da autora.

6.2 ELISA

No teste ELISA, quatro amostras foram positivas (n° 26 e 67, 68 e 36 – 4,6%), e 83 amostras foram negativas (95,4%) conforme apresentado na Figura 6.

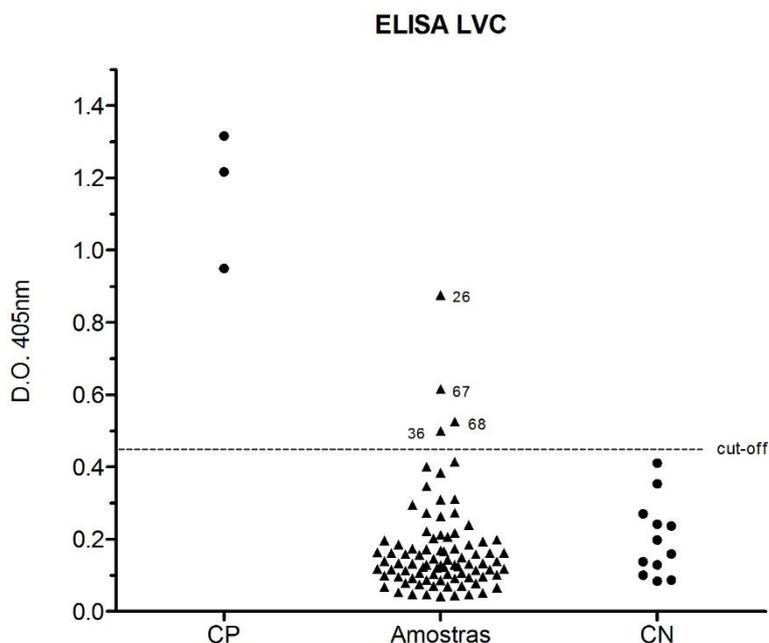


Figura 6 – Distribuição dos resultados de DO obtidos no teste de ELISA para LVC das 87 amostras de soro.

Fonte: Da autora.

Legenda: CP: Controle positivo. CN: Controle Negativo. D.O.: Densidade óptica

6.3 REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

Na Reação de Imunofluorescência Indireta (Figura 7), das 87 amostras estudadas, duas (2,3%) foram positivas com os títulos os títulos de 1/640 (amostra n°67) e 1/1280 (amostras n°68) e 85 amostras (97,7%) foram negativas (Tabela 1).

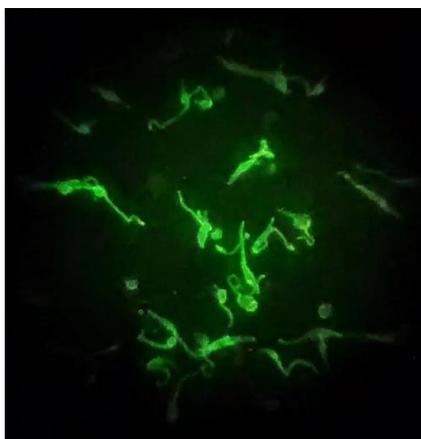


Figura 7 - Fluorescência dos parasitos, observada em amostra de cão positiva, submetida à reação de imunofluorescência indireta com formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

Fonte: Da autora.

Tabela 1- Amostras de cães positivos em testes sorológicos para LVC.

Amostra	DPP® LVC	ELISA LVC	RIFI LVC
24	+	-	-
26	+	+	-
36	-	+	-
39	+	-	-
44	+	-	-
48	+	-	-
56	+	-	-
67	+	+	+
68	+	+	+

Fonte: Da autora.

6.4 MÉTODOS MOLECULARES

Abaixo estão apresentados os resultados de PCR.

6.4.1 PCR Convencional com os marcadores RV1/RV2

A PCR convencional para detecção de DNA de *Leishmania (L.) infantum chagasi* foi realizada após a extração das amostras de sangue total dos 87 cães. Utilizando os iniciadores RV1/RV2 todas as amostras de sangue total apresentaram resultados negativos. As figuras 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 mostram as reações das amplificações utilizando RV1/RV2.

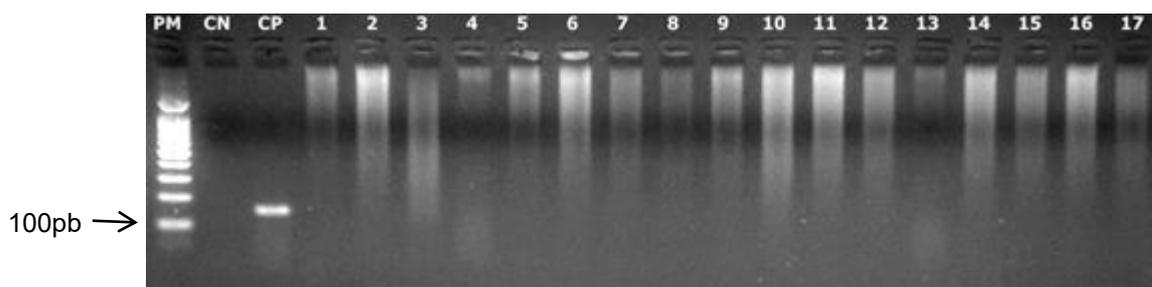


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (1-17).

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer RV1/RV2 que amplifica um fragmento de 145pb. CP: controle positivo. CN: controle negativo.

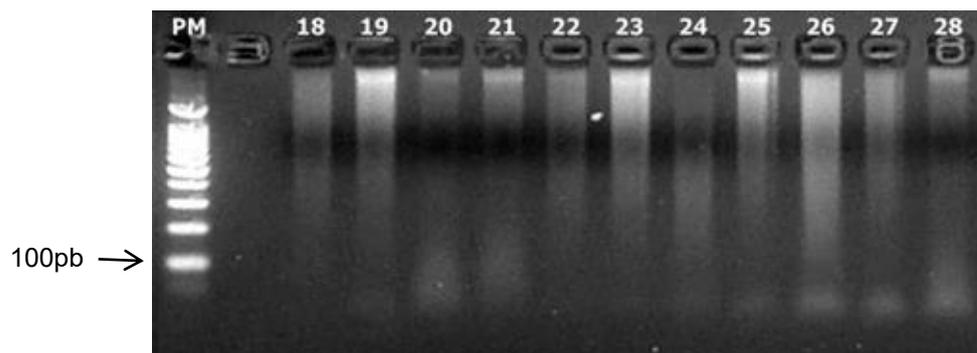


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (18-28).

Fonte: Da autora.

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer RV1/RV2 que amplifica um fragmento de 145pb.

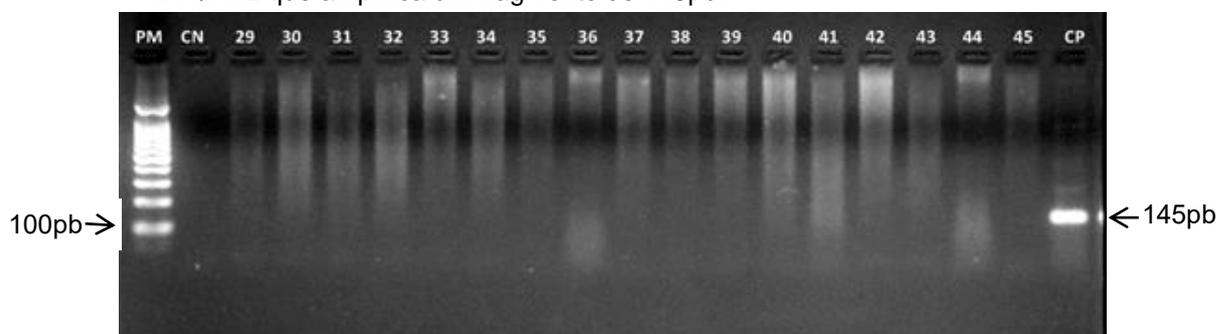


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (29-45).

Fonte: Da autora.

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer RV1/RV2 que amplifica um fragmento de 145pb. CP: controle positivo. CN: controle negativo.

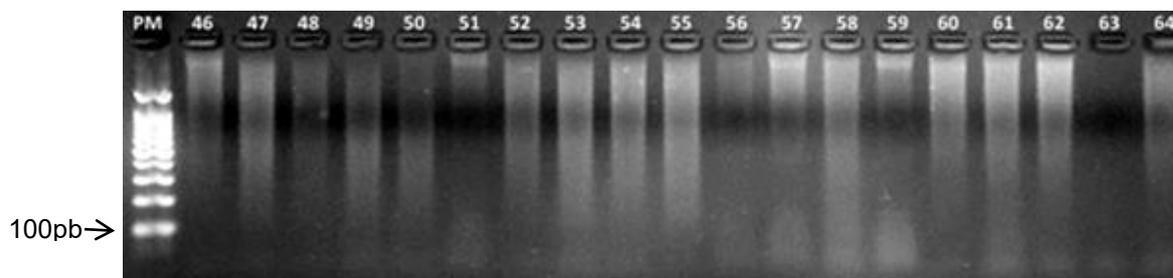


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (46-64).

Fonte: Da autora.

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer RV1/RV2 que amplifica um fragmento de 145pb.

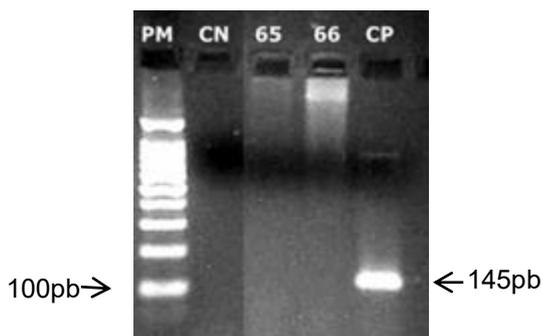


Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (65-66).

Fonte: Da autora.

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer RV1/RV2 que amplifica um fragmento de 145pb. CP: Controle Positivo, CN: Controle Negativo.

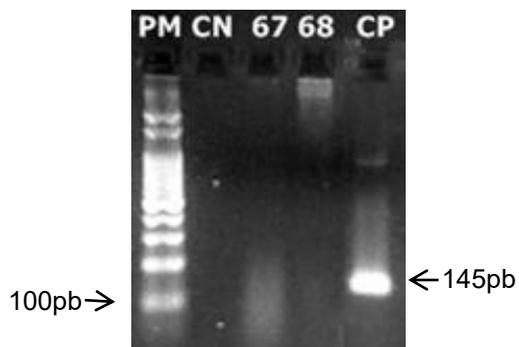


Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (67-68).

Fonte: Da autora.

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer RV1/RV2 que amplifica um fragmento de 145pb. CP: Controle Positivo, CN: Controle Negativo.

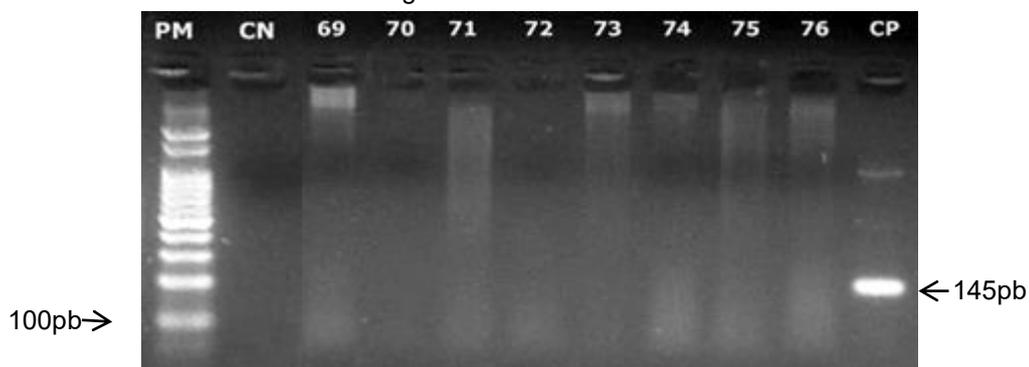


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (69-76).

Fonte: Da autora.

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer RV1/RV2 que amplifica um fragmento de 145pb. CP: Controle Positivo. CN: Controle Negativo.

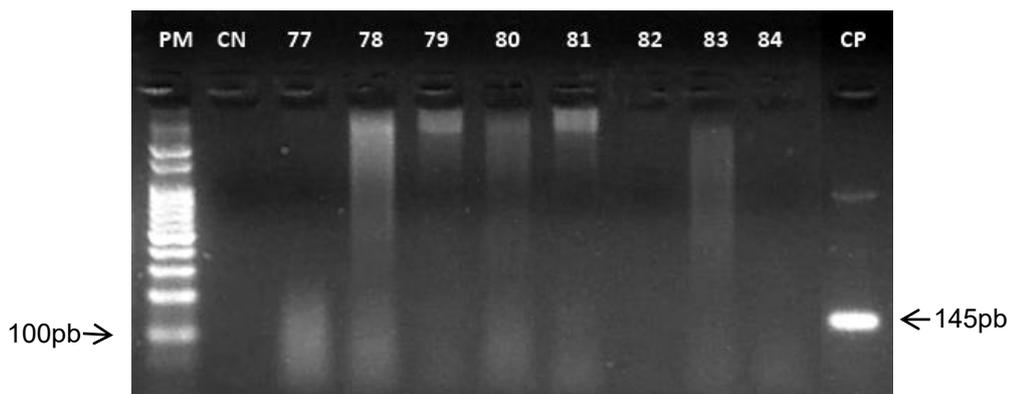


Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (77-84).

Fonte: Da autora.

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer RV1/RV2 que amplifica um fragmento de 145pb. CP: Controle Positivo. CN: Controle Negativo.

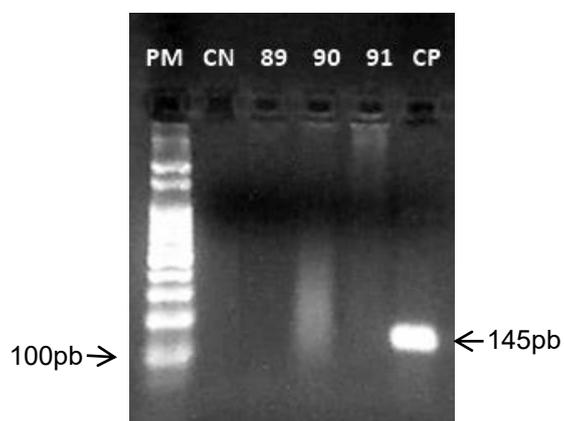


Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (89-91).

Fonte: Da autora.

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer RV1/RV2 que amplifica um fragmento de 145pb. CP: Controle Positivo, CN: Controle Negativo.

Como controle da reação, foi realizada PCR convencional utilizando o par de marcadores GAPDH-4 após a extração de DNA das amostras dos 87 cães. Este marcador foi utilizado para verificar a integridade do DNA canino extraído. As figuras 17 e 18 mostram as reações das amplificações para este marcador para as amostras que apresentaram resultados positivos em sorologia para LVC, sendo que todas as 87 amostras foram positivas.

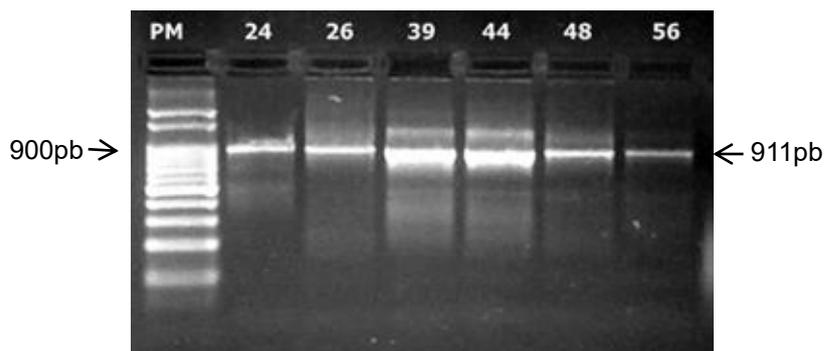


Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (animais que apresentaram resultados positivos em sorologia 24, 26, 39, 44, 48 e 56).

Fonte: Da autora.

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer GAPDH-4 que amplifica um fragmento de 911pb.

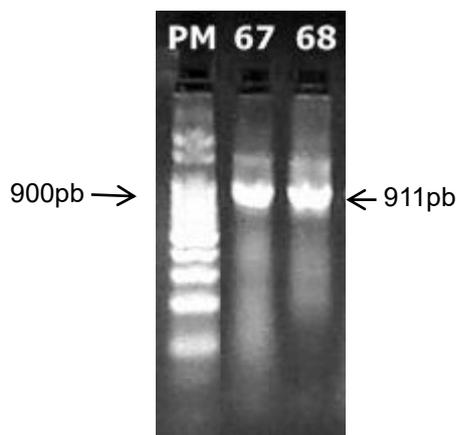


Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (67 e 68).

Fonte: Da autora.

Nota: PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer GAPDH-4 que amplifica um fragmento de 911pb.

6.4.2 PCR em Tempo Real

O marcador molecular LinJ31 foi selecionado como marcador para PCR em tempo real. As reações foram realizadas em um ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), em um volume final de 20 μ L por reação. Todas as 64 amostras de animais do canil municipal apresentaram resultados negativos em todas as análises realizadas para *Leishmania spp.* Dos animais atendidos em clínicas

veterinárias do município, dois animais (nº67 e 68) apresentaram resultados positivos. As demais amostras dos 21 cães apresentaram resultados negativos em todas as análises para *Leishmania spp.* Os animais que apresentaram reações na sorologia (nº 24, 26, 39, 44, 48 e 56) foram ainda submetidos à realização de PCR em tempo real com os marcadores Ldon e DNAPol, contudo todos confirmaram-se negativos, já para as amostras dos cães 67 e 68 apresentaram resultados positivos para os marcadores Ldon e DNAPol.

Os dois animais que apresentaram resultados positivos em sorologia (cães nº 67 e 68), que foram confirmados através do diagnóstico molecular com PCR em tempo real, apresentavam-se em péssimas condições de saúde, sendo que um deles não estava conseguindo se locomover sozinho, dessa forma, esses animais foram submetidos à eutanásia conforme as medidas preconizadas pelo Programa de Vigilância e Controle da LVC, uma vez que a doença em cães precede a doença em humanos e, após a eutanásia foram retirados fragmento de baço e fígado para realização de diagnóstico parasitológico e molecular.

A PCR convencional para detecção de DNA de *Leishmania (L.) infantum chagasi* foi realizada após a extração das amostras de baço e fígado dos cães que foram submetidos à eutanásia. Utilizando os marcadores RV1/RV2 as amostras apresentaram resultados positivos, assim como para o GAPDH que apresentou os resultados positivos. A figura 19 mostra as reações das ampliações utilizando os marcadores RV1/RV2.

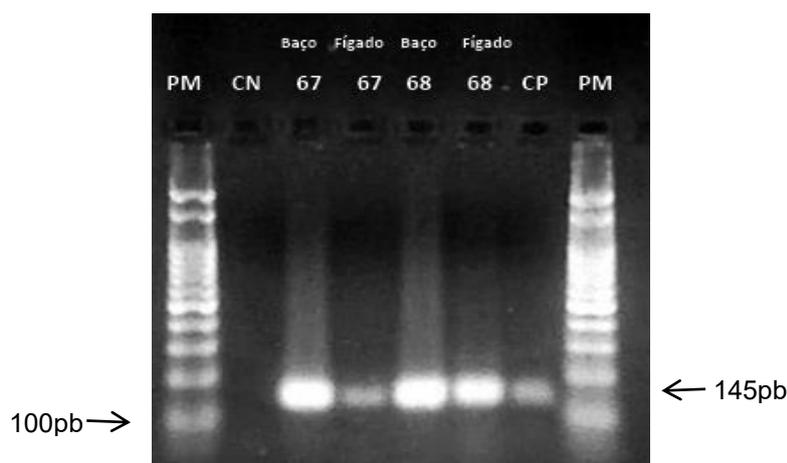


Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA extraídos das amostras de baço e fígado dos cães 67 e 68.

Fonte: Da autora.

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer RV1/RV2 que amplifica um fragmento de 145pb. CP: Controle Positivo. CN: Controle Negativo.

Para a PCR em tempo real utilizando os marcadores moleculares LinJ31, Ldon e DNAPol as duas amostras de baço e duas amostras de fígado dos cães apresentaram resultados positivos.

6.5 PARASITOLÓGICO

No diagnóstico parasitológico foi possível a visualização de formas amastigotas após a realização de *imprinting* nos fragmentos de baço dos cães n° 67 e 68 conforme a figura 20.

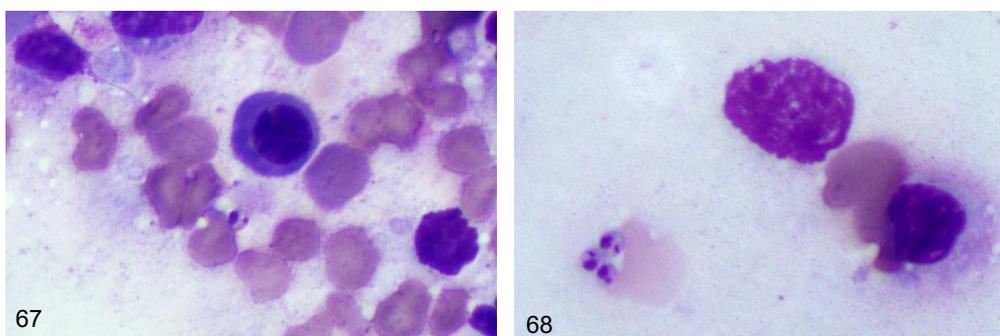


Figura 20 - Formas amastigotas observadas após coloração por Panótico Rápido® em *imprinting* de baço.

Fonte: Da autora.

6.6 SEQUENCIAMENTO

O material genético foi extraído e os produtos foram sequenciados utilizando o par de iniciadores LGITSF2/LGITSR2, que amplificaram fragmentos de sequências da região ITS2 do Gênero *Leishmania*. Uma vez que é possível a identificação da espécie de acordo com o tamanho e algumas mudanças de base no fragmento (DE ALMEIDA et al., 2011). As sequências dos nucleotídeos foram analisadas e editadas manualmente utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor versão 8.1. As sequências foram comparadas com as sequências genéticas já depositadas no GenBank no site BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), apresentando total identidade com *L. (L.) chagasi* (acesso AJ000304.1).

6.7 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS QUANTO A POSSÍVEIS REAÇÕES CRUZADAS

Foram realizados testes sorológicos de IFI para pesquisa de outros parasitos em todas as amostras de cães provenientes do canil municipal e para dois animais atendidos em clínicas veterinárias (n°65 e 66), os demais cães foram submetidos somente à RIFI para *Toxoplasma gondii* por se tratar do parasito que foi encontrado em maior quantidade de cães da primeira fase do estudo.

6.7.1 RIFI para *Toxoplasma gondii*

Os resultados dos testes sorológicos para *Toxoplasma gondii* revelaram *T. gondii* 30 amostras (34,5%) foram positivas conforme tabela 2.

6.7.2 RIFI para *Neospora caninum*

Os resultados dos testes sorológicos para *N. caninum* revelaram somente uma amostra positiva (n° 2) (1,5%) dentre as 66 amostras testadas conforme tabela 2.

6.7.3 RIFI para *Rickettsia sp.*

Nos testes sorológicos para *Rickettsia sp.* todas as amostras testadas apresentaram resultados negativos.

Tabela 2 - Amostras de cães positivos em testes sorológicos.

(Continua)

Amostra	RIFI <i>N. caninum</i>	RIFI <i>T. gondii</i>	LVC (DPP®, ELISA e RIFI)
2	+	-	-
4	-	+	-
5	-	+	-
6	-	+	-
14	-	+	-
15	-	+	-
20	-	+	-
22	-	+	-
24	-	-	+
25	-	+	-
26	-	-	+
35	-	+	-
36	-	+	+
39	-	-	+
40	-	+	-
44	-	-	+
46	-	+	-
47	-	+	-
48	-	-	+
51	-	+	-
53	-	+	-
54	-	+	-
56	-	-	+
58	-	+	-
62	-	+	-
63	-	+	-
67	NR	+	+

Amostra	(Conclusão)		
	RIFI <i>N. caninum</i>	RIFI <i>T. gondii</i>	LVC (DPP®, ELISA e RIFI)
68	NR	+	+
69	NR	+	-
70	NR	+	-
71	NR	+	-
72	NR	+	-
73	NR	+	-
75	NR	+	-
80	NR	+	-
84	NR	+	-
89	NR	+	-

Fonte: Da autora

Nota: NR: Não realizado nas amostras.

6.7.4 PCR convencional para outros agentes

Os resultados de PCR utilizando o par de iniciadores 609F/706R, marcador que amplifica um fragmento de 900 bp correspondente a sequência parcial do SSU rDNA (região V7/V8) apresentaram todos os resultados negativos para as 66 amostras testadas (amostras n° 1 ao n° 66).

Nos resultados de PCR utilizando o par de iniciadores P18/P20, que amplifica um fragmento de 880pb correspondente à sequência do gene mitocondrial do citocromo B de *Trypanosoma cruzi* todas as amostras (n° 1 ao 17) testadas apresentaram resultados negativos. As figuras 22 e 23 mostram as reações das ampliações utilizando P18/P20.



Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corados por SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies Corporation, Carlsbad, Ca) de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (1-11).

Fonte: Da autora.

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer P18/P20 que amplifica um fragmento de 880pb. C+: Controle Positivo. C-: Controle Negativo.



Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corados por SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies Corporation, Carlsbad, Ca) de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (12-17).

Fonte: Da autora.

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer P18/P20 que amplifica um fragmento de 880pb. C+: Controle Positivo.

Os resultados de PCR utilizando o par de iniciadores chiF/chiR, marcador que amplifica o gene quitinase de 1000pb revelaram presença de algumas amostras positivas (n° 40 e 65). As figuras 24, 25, 26 e 27 mostram as reações das ampliações utilizando chiF/chiR.

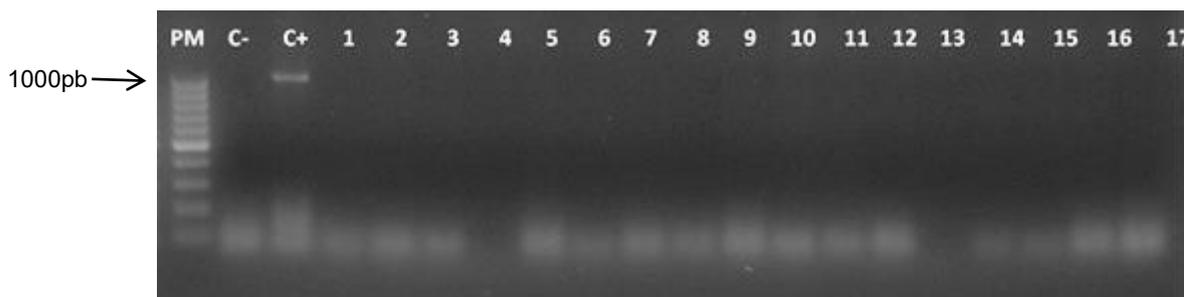


Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corados por SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies Corporation, Carlsbad, Ca) de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (1-17).

Fonte: Da autora.

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer chiF/chiR que amplifica um fragmento de 1000pb. C+: Controle Positivo, C-: Controle Negativo.

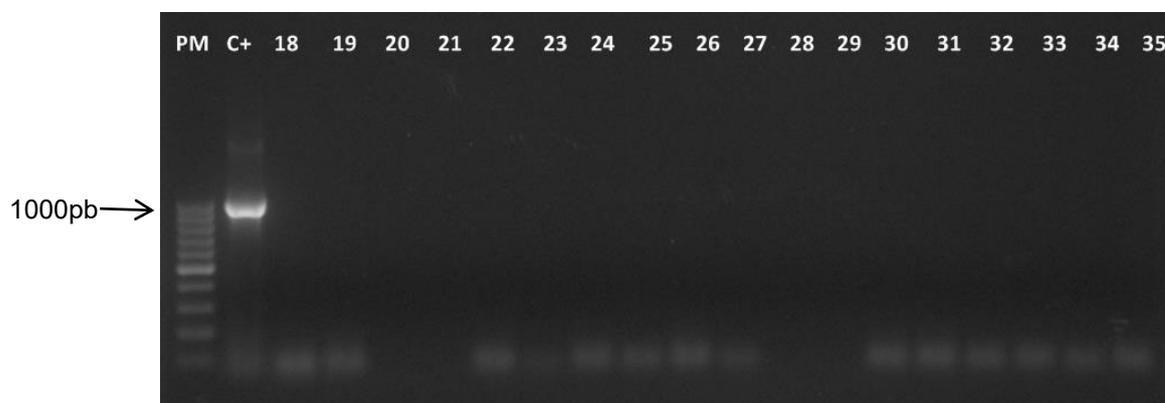


Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corados por SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies Corporation, Carlsbad, Ca) de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (18-35).

Fonte: Da autora.

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer chiF/chiR que amplifica um fragmento de 1000pb. C+: Controle Positivo.

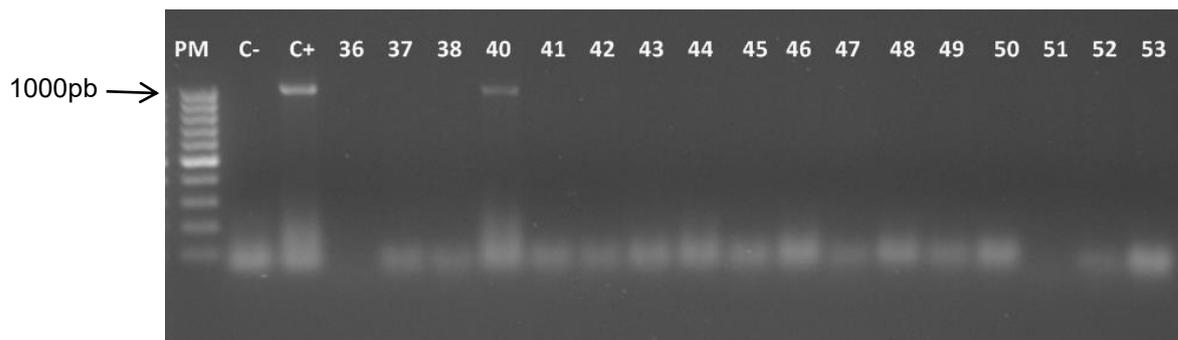


Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corados por SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies Corporation, Carlsbad, Ca) de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (36-38; 40-53).

Fonte: Da autora.

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer chiF/chiR que amplifica um fragmento de 1000pb. Nota-se presença de banda em amostra n°40. C+: Controle Positivo, C-: Controle Negativo.

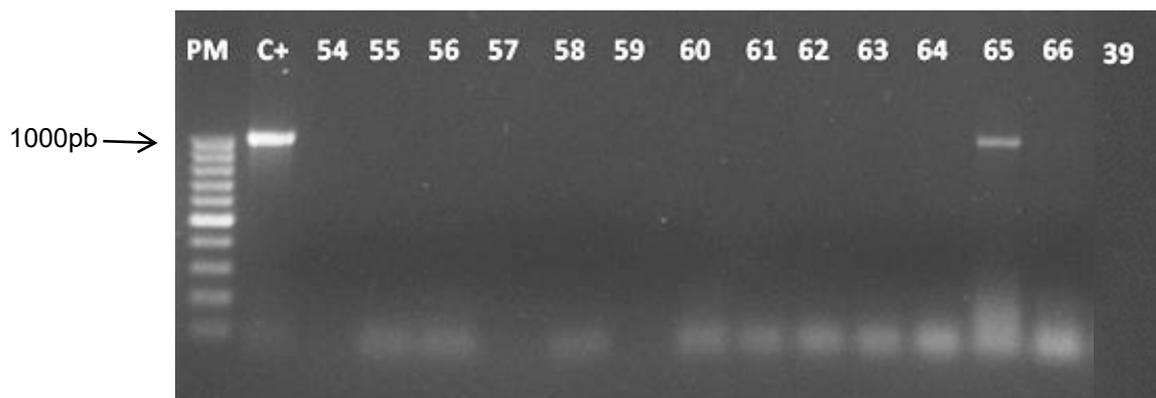


Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corados por SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies Corporation, Carlsbad, Ca) de produtos amplificados a partir de DNA extraídos de sangue total de cães (54-66; 39).

Fonte: Da autora.

Nota: PM: Peso Molecular. PM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer chiF/chiR que amplifica um fragmento de 1000pb. Nota-se presença de banda em amostra n°65. C+: Controle Positivo.

6.8 INQUÉRITO DE FLEBOTOMÍNEOS

Foi realizado o inquérito de flebotomíneos no canil municipal e na propriedade onde se encontravam os animais positivos para LVC em Paraguaçu, no entanto não foi encontrado nenhum exemplar nesses locais.

7 DISCUSSÃO

Atualmente o Programa do Ministério da Saúde, para o controle da leishmaniose visceral, recomenda a realização de inquéritos sorológicos de casos caninos suspeitos através de triagem com teste rápido DPP® e confirmação com o ELISA (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Quando o cão é confirmado positivo por esses testes sorológicos é indicada a eutanásia como uma medida de controle para evitar a disseminação da doença tanto em humanos quanto em outros animais.

No presente estudo oito animais foram reagentes para LVC no teste rápido DPP®, sendo que dois desses animais mantiveram-se positivos no teste de ELISA, e dois foram indeterminados, mas não foi encontrado DNA de *L. infantum* pelo método de PCR Convencional utilizando RV1/RV2 nas amostras de sangue, somente nas amostras de baço e fígado que foram coletados após a eutanásia dos animais. Na PCR em Tempo Real utilizando os iniciadores LinJ31, DNAPol e Ldon os resultados foram positivos para os dois animais oriundos de Paraguaçu, tanto nas amostras de sangue, quanto nas de baço e fígado. Esse fato pode ser devido à maior sensibilidade de detecção do PCR em Tempo Real, capaz de detectar 0,001 parasitos por reação, o que corresponde a aproximadamente 0,2 parasitos/mL de amostra (FRANCINO et al., 2006), quando comparado ao PCR Convencional. Os demais animais do estudo confirmaram-se negativos em todos os testes de PCR Convencional e em Tempo Real.

A presença de anticorpos anti-*Leishmania* nos testes sorológicos e a confirmação através de PCR Convencional e em Tempo Real, juntamente com a identificação através do sequenciamento com total compatibilidade com *L. (L.) chagasi*, indicam os primeiros casos de animais positivos para Leishmaniose Visceral no município de Paraguaçu. Um dos cães nasceu e foi criado na residência, sem nunca ter viajado para áreas endêmicas para LVC, portanto confirma-se como primeiro caso autóctone. O outro cão era de procedência desconhecida, tendo sido recolhido pelo proprietário dos cães já adulto da rua, e ambos cães conviveram juntos por toda a vida, dessa forma não é possível determinar a origem desse caso. Os achados positivos para LVC nesses animais que foram atendidos em clínicas veterinárias de Alfenas confirmam nossa hipótese de circulação de animais positivos no município, devido à grande circulação de pessoas, muitas vezes com seus animais de estimação.

A doença tem se espalhado para diversas áreas consideradas anteriormente como não endêmicas, de acordo com os relatos de Campos et al., 2013 dos primeiros casos no Rio de Janeiro, surtos de LVC no interior de São Paulo (ZUBEN et al., 2014), o que justifica a realização de inquéritos numa tentativa de vigilância da disseminação da doença para outros animais, humanos e para áreas outras áreas.

Os resultados positivos para LVC em sorologia nos animais do canil municipal e atendidos em clínicas veterinárias e não confirmados através da PCR podem ser devido à reações cruzadas com outros agentes. Silva et al. (2011) analisando 155 cães que foram eutanasiados após apresentarem resultados positivos em sorologia, encontrou 59% desses animais negativos para *L. (L.) infantum chagasi* através de outros testes de diagnóstico, inclusive por PCR, sendo que nesses animais foram encontrados *L. braziliensis*, *Trypanosoma caninum* ou simplesmente nenhum parasito foi isolado.

Alves et al. (2012) analisou soro de cães de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso infectados com *Trypanosoma caninum*, ou com *L. chagasi* ou animais saudáveis, para avaliar a presença de anticorpos para *T. caninum*, *L. (L.) chagasi* e a reatividade cruzada entre os anticorpos através de DPP, RIFI e ELISA. No grupo de cães positivos para *L. (L.) chagasi*, encontrou 100% reativos para *T. caninum* com o uso de antígenos de *T. caninum* pelos métodos de RIFI e ELISA *in house*, e nos resultados de DPP para LVC, no grupo de cães positivos para *T. caninum*, 5,1% dos animais foram positivos para *L. (L.) chagasi*, confirmando a reatividade cruzada entre esses dois agentes. Os autores sugerem ainda que *T. caninum* induzir pouca resposta humoral e em condições gerais, sendo muito frequente em cães saudáveis, não acarretando danos gerais à saúde dos animais. No grupo de cães saudáveis foram encontrados anticorpos de *T. caninum* em 53,8% das amostras através de RIFI e 28,2% pelo ELISA, demonstrando o pouco conhecimento sobre a incidência desse parasito na população canina, o que pode ser um grande problema em áreas endêmicas para LVC. Observou-se nesse estudo que 23% dos animais que eram infectados somente com *T. caninum*, foram reagentes em algum teste sorológico para LVC, portanto erroneamente diagnosticados.

Madeira et al. (2014) analisando amostras de cães de Cuiabá, encontrou co-infecções entre *T. caninum* e *L. (L.) chagasi*, demonstrou ainda que *T. caninum* geralmente está presente na pele dos animais, induz pouca ou nenhuma resposta imune humoral, mas que é capaz de apresentar reações em testes sorológicos para

LVC, como ELISA, RIFI e DPP. Foi possível a identificação de *T. caninum* através de métodos de PCR, e um dos cães apresentou um perfil de amplificação de genes de *T. caninum* semelhante a *L. (L.) chagasi* utilizando amostras de medula óssea. Assim concluíram que a escolha do material adequado para a pesquisa desse parasito é a pele íntegra, que é o habitat natural desse parasito, o que justifica a baixa resposta humoral, e que *L. (L.) chagasi* e *T. caninum* podem ser encontrados concomitantes no mesmo animal. Reforçam ainda que *T. caninum* não é patogênico ou virulento para cães e o curso da infecção é assintomático e transitório com baixa resposta imune humoral.

Estudos tem demonstrado que animais assintomáticos apresentam baixo parasitismo tecidual, principalmente em pele, e que com a progressão da doença o parasito pode ser encontrado de forma evidente em outros locais, especialmente no baço, onde ocorre a ativação celular logo após a infecção e é considerada a chave para a multiplicação dos parasitos. Esse perfil de resposta à infecção varia de acordo com o sistema imune individual (REIS et al., 2013). Assim embora possa ocorrer a produção de anticorpos, dependendo do estágio da infecção, da resposta imune ao avanço da doença, e da amostra utilizada pode-se não atingir o limiar de detecção dependendo da técnica molecular escolhida, o que pode ser sugerido na PCR Convencional nas amostras de sangue dos cães de Paraguaçu e no cão n° 26 do canil que apresentou duas técnicas sorológicas positivas, porém todas as técnicas moleculares negativas. Retornamos ao canil para uma nova coleta de material para melhor elucidação do caso, porém não foi possível pois o animal veio a óbito em decorrência de confrontos com outros cães.

Lutzomyia longipalpis é considerado o principal vetor de LV e a espécie mais predominante, altamente adaptada às condições do ambiente urbano tanto no intradomicílio, quanto peridomicílio (LAINSON; RANGEL, 2005). Em nosso estudo não foram encontrados exemplares de *L. longipalpis* ou de outros flebotomíneos que justificassem a transmissão entre os casos positivos para LVC, no entanto essa ausência de flebotomíneos pode ser devido ao curto período de tempo em que foram realizadas as capturas.

O gene citocromo B está presente na região mitocondrial do kinetoplasto de tripanosomatídeos, participa da cadeia respiratória e é utilizado como marcador filogenético para *Trypanosoma cruzi* (BRISSE et al., 2003). Esse gene foi utilizado no

presente estudo para realização de PCR com os iniciadores P18/P20 para algumas amostras, contudo todas essas amostras testadas foram negativas.

O par de iniciadores 609F/706R, marcador que amplifica um fragmento de 900pb correspondente a sequência parcial do SSU rDNA (região V7/V8) tem sido utilizado para análise filogenética e taxonômica entre espécies de *Trypanosoma* (DA SILVA et al., 2004; MARCILI et al., 2009), no entanto em nosso estudo não foram encontradas amostras positivas para esse gene.

O gene quitinase participa da interação entre *Leishmania* spp e flebotomíneo. O flebotomíneo possui estruturas porosas de quitina, durante a ingestão de sangue produz uma membrana peritrófica relacionada à sua digestão, quando ele ingere tripanosomatídeos esses tem a capacidade de degradar essa membrana e produzir enzimas quitinolíticas que irão degradar a estrutura do flebotomíneo, permitindo sua migração e desenvolvimento no interior do intestino do inseto (SCHLEIN; JACOBSON; SHLOMAI, 1991). Com essa descoberta desenvolveram-se estudos baseado em isoenzimas para estudos filogenéticos utilizando o gene quitinase presente na *Leishmania* para desenvolvimento de marcadores de microssatélites para esclarecer a classificação dessa espécie no leste da África (JAMJOOM et al., 2004). Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que duas amostras foram positivas utilizando esses marcadores, sugerindo a presença de algum parasito da família Trypanosomatidae nos cães do canil municipal, mas que não foram positivos para os testes de LVC.

As amostras do presente estudo foram submetidas à realização de RIFI para *T. gondii* e *N. caninum* na tentativa de avaliar a possibilidade de reação cruzada com esses parasitos. Apesar dos resultados de 1,5% para *N. caninum* e 34,5% para *T. gondii* (Tabela 2) houve relação de amostras positivas somente entre os cães 67 e 68 que foram positivos em todos os métodos para LVC. Os demais animais não tiveram associação entre animais positivos para *T. gondii* e *N. caninum* e positivos para *L. (L.) infantum chagasi*, semelhante aos achados de Ribeiro et al. (2011) que encontrou animais positivos para *L. (L.) infantum chagasi*, e alguns co-infectados com *N. caninum* e *T. gondii*, mas também animais negativos para *L. (L.) infantum chagasi* e com a presença de anticorpos para *T. gondii* e *N. caninum*.

Alguns autores demonstram a ocorrência de coinfecção entre *Leishmania* e *T. gondii* através de métodos sorológicos realizados em felinos domésticos (BRAGA et al., 2014), isso pode ser observado nos cães 67 e 68 que apresentaram todos os

resultados positivos para LVC e resultados positivos para *T. gondii*, no entanto para o cão 36 que apresentou positividade para *T. gondii* e ELISA para LVC não confirmado por nenhum outro método de diagnóstico para LVC pode ser devido à reatividade cruzada dos anticorpos com algum outro patógeno.

Em contrapartida outros autores sugerem a ocorrência de coinfeção entre *Leishmania*, *Babesia* e *Ehrlichia* através de métodos sorológicos de IFI, ELISA e DPP®, inferindo que a frequência desses patógenos é alta em áreas com alta densidade de ectoparasitas, e que, devido à distância filogenética entre esses patógenos e *Leishmania* a reação cruzada é improvável, sendo mais frequente a reatividade cruzada entre tripanosomatídeos (KRAWCZAK et al., 2015).

Foi realizada RIFI para cinco espécies de *Rickettsia* (*Rickettsia amblyommii*, *R. bellii*, *R. rhipicephali*, *R. parkeri* e *R. rickettsii*) no intuito de se encontrar algum tipo de reação cruzada com os testes sorológicos para *L. (L.) infantum chagasi*, no entanto todas as amostras testadas foram negativas para as cinco espécies, provavelmente devido à ausência do principal vetor dessas espécies, que são carrapatos do Gênero *Amblyomma* (LABRUNA, 2009).

A presença de anticorpos anti-*Leishmania* nos testes sorológicos e a confirmação através de PCR Convencional e qPCR, juntamente com a identificação através do sequenciamento com total compatibilidade com *L. (L.) chagasi*, indicam os primeiros casos de animais positivos para LVC no município de Paraguaçu. Um dos cães nasceu e foi criado na residência, sem nunca ter viajado para áreas endêmicas para LVC, confirmando o primeiro caso autóctone desta doença neste município. O outro cão era de procedência desconhecida, tendo sido recolhido já adulto da rua não sendo possível determinar a origem desse caso; no entanto ambos conviveram juntos por longos anos. Os achados positivos para LVC nesses animais atendidos em clínicas veterinárias de Alfenas sugerem a hipótese de circulação de animais positivos no município, devido à grande circulação de pessoas, muitas vezes com seus animais de estimação.

O Sul de Minas Gerais possui um grande número de plantações de café tanto em áreas urbanas quanto próximas ao ambiente urbano, chegando muitas vezes ao peridomicílio. Estudo realizado em Machado (21°39'S, 45°55'W- cerca de 30Km de Alfenas), em inquérito de flebotomíneos em plantações de café encontrou exemplares envolvidos na transmissão de Leishmaniose Tegumentar Americana (ALEXANDER et al., 2002), assim a manutenção de flebotomíneos nesse tipo de plantação, abundante

na região, oferece o risco de transmissão de *Leishmania* para humanos e animais. Estudos da fauna de flebotomíneos na cidade de Conceição Aparecida (21°06'S, 46°13'W – cerca de 50Km de Alfenas), detectaram espécies de vetores de LTA e alguns exemplares de *Lu. longipalpis* (LOIOLA; SILVA; GALATI, 2007). No período do estudo não haviam sido encontrados cães ou humanos infectados com *Leishmania* no município.

Na cidade de Bom Sucesso, sul de Minas Gerais (21°02' S, 44°45'W – cerca de 150Km) foi encontrado o primeiro caso canino positivo no ano de 1999. Nos anos seguintes foram realizados inquéritos em cães, com achados de alguns animais reagentes oriundos do município e de cidades vizinhas. Foi realizado ainda inquérito de flebotomíneos, mas não foi encontrado nenhum exemplar no município (SILVA; SANTA ROSA, 2005; SILVA et al., 2008). Já na cidade de Lavras (21°14'S, 44°59'W - cerca de 140Km de Alfenas) em inquéritos de flebotomíneos numa área com presença de galinhas foram encontrados exemplares de *Lu longipalpis* e de cães infectados no mesmo ambiente. Analisando estudos de outro município, Juiz de Fora (21°14' S, 42°14' W – cerca de 380Km de Alfenas, próximo ao estado de Rio de Janeiro e distância de cerca de 240Km de Lavras) relataram os primeiros casos caninos positivos para LVC (CASTRO-JÚNIOR et al., 2014).

Outro inquérito de flebotomíneos na cidade de Espírito Santo do Pinhal, estado de São Paulo (22°06'S, 46°26'W – cerca de 170Km de Alfenas), município limítrofe com cidades do sul de Minas Gerais, encontrou diversos exemplares vetores de LTA e LVA, tanto em áreas rurais quanto urbanas. Cria-se um alerta aos serviços de saúde quanto ao risco de transmissão para humanos, pois também foram encontrados cães positivos para *L. (L.) infantum chagasi* (COLLA-JACQUES; CASANOVA; PRADO, 2010).

Assim, confirma-se a expansão da doença em Minas Gerais em áreas localizadas no sul e sudeste do estado, com a presença de flebotomíneos e cães infectados, além da proximidade com áreas endêmicas de LVC nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, o que pode facilitar a circulação dos vetores e reservatórios.

Portanto, os testes sorológicos reagentes para LVC nos cães do canil e de clínicas veterinárias com resultados negativos em PCR, reforçam a hipótese de reação cruzada com outros agentes, sejam eles tripanossomatídeos como *T. cruzi* e *T. caninum* (ALVES et al., 2012; BRAGA; LANGONI; LUCHEIS, 2014), a *Toxoplasma gondii* (PAULAN et al., 2013; VALADAS et al., 2010) ou outros agentes, mesmo não

tendo sido possível identificar qual espécie apresentou reatividade cruzada nos testes sorológicos para LVC. Sugere-se ainda a possibilidade de coinfeção entre *Leishmania* e *T. gondii* nos cães 67 e 68. Dessa forma em áreas com circulação de outros parasitos que reagem nos testes sorológicos para leishmaniose sugere-se associação com outros métodos diagnósticos, visto que os animais reagentes nos testes devem ser eutanasiados conforme recomendações do Programa de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde.

A leishmaniose visceral teve grande expansão nos últimos anos, sendo assim a importância de vigilância sorológica associada à realização de testes moleculares em municípios não endêmicos é uma forma de monitoramento da progressão da doença, numa tentativa de evitar a ocorrência de surtos.

8 CONCLUSÃO

Conclui-se que no período do estudo, nos animais residentes no canil municipal e oriundos de clínicas veterinárias residentes em Alfenas, após a realização dos ensaios sorológicos e moleculares, não foi confirmada a transmissão da Leishmaniose Visceral Canina, pois apesar dos resultados reagentes em sorologia para LVC, não foram confirmados pelo diagnóstico molecular, tanto na PCR Convencional, quanto PCR em Tempo Real.

Sugere-se a ocorrência de reações cruzadas com outros patógenos, através do diagnóstico sorológico, nos animais que apresentaram resultados positivos para LVC não confirmados no diagnóstico molecular, mesmo não sendo possível estabelecer a qual microrganismo, dessa forma são necessários outros estudos para se estabelecer a qual agente infeccioso se deve a reatividade cruzada; e indica-se ainda a ocorrência de coinfeção entre *Leishmania* e *T. gondii* em dois cães do estudo.

Os dois cães oriundos da cidade de Paraguaçu, que foram atendidos em clínicas veterinárias de Alfenas, foram positivos para LVC, através de métodos sorológicos, moleculares e parasitológico.

Os resultados do sequenciamento das amostras de cães oriundos de Paraguaçu confirmaram os primeiros casos positivos de LVC no município, sendo que um dos casos é autóctone; sugerindo dessa forma a circulação de LVC no município de Alfenas-MG

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, B. et al. Transmission of Leishmania in coffee plantations of Minas Gerais, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 627–630, 2002.
- ALVES, A. S. et al. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by Trypanosoma caninum. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 3, p. 1329–1333, 2012.
- AMUSATEGUI, I. et al. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of Epidemiology**, v. 18, n. 2, p. 147–156, 2003.
- ASATO, Y. et al. Phylogenic analysis of the genus Leishmania by cytochrome b gene sequencing. **Experimental Parasitology**, v. 121, n. 4, p. 352–361, 2009.
- BADARÓ, R. et al. rK39: a cloned antigen of Leishmania chagasi that predicts active visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 173, n. 3, p. 758–61, Mar. 1996.
- BARBOSA, D. S. et al. Spatial analysis for identification of priority areas for surveillance and control in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. **Acta Tropica**, v. 131, p. 56–62, Mar. 2014.
- BARÇANTE, T. A. et al. Scientific Note First report of the main vector of visceral leishmaniasis in America , Lutzomyia longipalpis (Lutz Neiva, 1912) (Diptera : Psychodidae : Phlebotominae), in southern Minas Gerais State , Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 40, n. 2, p. 1–3, 2015.
- BERRAHAL, F. et al. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 3, p. 273–7, Sept. 1996.
- BHATIA, A. et al. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of Leishmania chagasi. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 102, n. 2, p. 249–61, 20 Aug. 1999.
- BISUGO, M. C. et al. Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas

do estado de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 2007. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/7763>>. Acesso em: 18 maio. 2015

BOGGIATTO, P. M. et al. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, p. e1019, Jan. 2011.

BRAGA, A. R. C. et al. Coinfection by *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. in domestic cats (*Felis catus*) in State of Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 796–797, Dec. 2014.

BRAGA, A. R. C.; LANGONI, H.; LUCHEIS, S. B. Evaluation of canine and feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 20, p. 5, 2014.

BRASIL. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saúde Brasil 2008 : 20 anos de Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil**. Brasília: Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Visceral: Recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília: Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Coef-Incidencia.pdf>>. Acesso em: 27 abr. 2015a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Óbitos de Leishmaniose Visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2013**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Nov/22/LV_Letalidade.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2015b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7a. ed. Brasília: Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. Nota técnica conjunta no 01/2011. Brasília, 2011.

BRETAGNE, S. et al. Real-Time PCR as a New Tool for Quantifying *Leishmania infantum* in Liver in Infected Mice Real-Time PCR as a New Tool for Quantifying *Leishmania infantum* in Liver in Infected Mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 8, n. 4, p. 828, 2001.

BRISSE, S. et al. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 2, p. 173–183, 2003.

BURNS, J. M. et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 2, p. 775–9, 15 Jan. 1993.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. et al. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo**. p. 158, 2006.

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revta Bras. Patol. Clín.** v. 10, p. 143-171, 1974.

CAMPOS, M. P. DE et al. First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Volta Redonda, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. August 2011, p. 424–426, 2013.

CASTRO-JÚNIOR, J. G. et al. Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* Infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais State, Brazil, based on immunochromatographic dual-path platform (DPP®) and PCR assays. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 3, p. 225–229, 2014.

CHULAY, J. D.; BRYCESON, A. D. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 3, p. 475–9, May 1983.

COLLA-JACQUES, F. E.; CASANOVA, C.; PRADO, A. P. DO. Study of sand fly fauna in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis and canine visceral

leishmaniasis in the municipality of Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 208–15, Mar. 2010.

COLOMBO, F. A. et al. Detection of Leishmania (Leishmania) infantum RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v. 109, n. 2, p. 267–274, 11 Jan. 2011.

COLOMBO, F. A. **Detecção de RNA de Leishmania (Leishmania) infantum chagasi em pulgas e carrapatos coletados de cães naturalmente infectados e padronização de uma PCR em tempo real para diagnóstico e diferenciação de espécies de Leishmania**. 2012. 101f. Tese (Doutorado em Ciências) - Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de São Paulo do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2012.

COSTA, C. H. N. et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 386–392, 2010.

COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005a, p. 697-712..

COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005b, p. 713-732.

COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005c, p. 733-738.

DA SILVA, F. M. et al. Phylogeny, taxonomy and grouping of Trypanosoma rangeli isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 129, p. 549–561, 2004.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151–156, 2006.

DE ALMEIDA, M. E. et al. Identification of Leishmania spp. by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of rRNA internal transcribed spacer 2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3143–3149, 2011.

DE ARAÚJO, V. E. M. et al. Early clinical manifestations associated with death from visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1511, 7 Jan. 2012.

DE FREITAS, E. et al. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 159–167, Apr. 2006.

DOURADO, Z. F. ET AL. Panorama Histórico do Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Visceral até o Surgimento dos Testes Imunocromatográficos (RK39). **Revista de Patologia Tropical**, 2007. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/3172>>

DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269–85, 1 May 1988.

FAYET, G. Canine leishmaniasis in Europe; Part 2: Pathogenesis – Clinical signs – Diagnosis, **Meril Biological Technical Bulletin**, 1999.

FORATTINI, O. P. **Ecologia, Epidemiologia e Sociedade**. São Paulo: Artes Médicas. 1992.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 214–21, 30 Apr. 2006.

GOMES, A. H. S. et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 3-4, p. 234–41, 31 Mar. 2007.

GRIMALDI, G. J.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 3, p. 230–250, 1 July. 1993.

GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 2, n. 8, p. 494–501, Aug. 2002.

HORTA, M. C. et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: Serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and

another spotted fever gro. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 1, p. 93–97, 2004.

JAMJOOM, M. B. et al. *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *L. infantum* and “*L. archibaldi*” from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. **Parasitology**, v. 129, n. 1919, p. 399–409, 2004.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 177–185, May 2010.

KRAWCZAK, F. DA S. et al. *Leishmania*, *Babesia* and *Ehrlichia* in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 64–68, Feb. 2015.

KULLBERG, M. et al. Housekeeping genes for phylogenetic analysis of eutherian relationships. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 8, p. 1493–503, 1 Aug. 2006.

LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156–66, May 2009.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 569–96, Jan. 1983.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil—a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, Sept. 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **Topley & Wilson’s Microbiology and Microbial Infections**. 9. ed. London: Feg Cox, 1998, p. 241-266.

LE FICHOUX, Y. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1953–1957, June 1999.

LINDOSO, J. A. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3136, Sept. 2014.

LOIOLA, C. F.; SILVA, D. A.; GALATI, E. A. B. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and species abundance in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 581–585, Aug. 2007.

MADALOSSO, G. et al. American visceral leishmaniasis: factors associated with lethality in the state of São Paulo, Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 281572, Jan. 2012.

MADEIRA, M. F. et al. Trypanosoma caninum, a new parasite described in dogs in Brazil: aspects of natural infection. **The Journal of Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 231–234, Apr. 2014.

MARCILI, A et al. A new genotype of Trypanosoma cruzi associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, p. 641–655, 2009.

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.

MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, p. 41–45, 2004.

NARDO, C. D. D. DE et al. Detecção de anticorpos anti-*Leishmania infantum* syn chagasi em cães de São José do Rio Preto, São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 1 Oct. 2011. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/34409>>. Acesso em: 3 set. 2015

NATAL, D. et al. Modificação da armadilha CDC com testes para coletas de flebotomíneos (Diptera). **Revista Brasileira Entomologia**. v. 35, p. 697-700, 1991.

NOLI, C. Canine Leishmaniasis. **Waltham Focus**, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

OLIVEIRA, C. D. L. et al. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 5, p. 1231–1239, Oct. 2001.

OLIVEIRA, C. D. L.; MORAIS, M. H. F.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. **Cadernos de saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2953–2958, 2008.

OWENS, S. D. et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1076–83, 15 Oct. 2001.

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. 1184–91, 1 June. 2010.

PAULAN, S. DE C. et al. Seroprevalence rates of antibodies against *Leishmania infantum* and other protozoan and rickettsial parasites in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 162–166, Mar. 2013.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915–34, 1 Dec. 2009.

RAVEL, S. et al. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. **Acta tropica**, v. 59, p. 187–196, 1995.

REIS, L. E. S. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 498–503, 2013.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001a. p. 214-226.

REY L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001b. p. 227- 239.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2001c. p. 253-266.

RIBEIRO, R. R. et al. Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs with visceral leishmaniasis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 527–532, 2011.

ROMERO, G. A S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, 2010.

ROSYPAL, A. C. et al. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **The Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970–2, 24 Aug. 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbour Laboratory. 1989.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L.; SHLOMAI, J. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 245, p. 121–126, 1991.

SIDDIG, M. et al. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 66–8, Jan. 1988.

SILVA, D. A. et al. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 1-3, p. 257–261, 2011.

SILVA, R. M. et al. TG-ROC analysis of immunofluorescence assays in canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Revista de saúde pública**, v. 43, n. 6, p. 1044–53, Dec. 2009a.

SILVA, F. L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 55–9, 9 Mar. 2009b.

SILVA, M. R. et al. Autochthonous canine visceral leishmaniasis in a non-endemic area: Bom Sucesso, Minas Gerais State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 281–286, Feb. 2008.

SILVA, M. R.; SANTA ROSA, I. C. DE A. Levantamento de leishmaniose visceral canina em Bom Sucesso, Minas Gerais. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 69–74, 2005.

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

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 98, Jan. 2012.

SUNDAR, S. et al. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **Lancet**. London, v. 351, n. 9102, p. 563–5, 21 Feb. 1998.

TABAR, M. D. et al. Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. **Journal of Small Animal Practice**, v. 49, n. 7, p. 325–328, 2008.

TRONCARELLI, M. Z. et al. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 118–123, 2009.

TYLER, K. M. Review of “*Leishmania*- after the Genome” by Peter J. Myler and Nicolas Fasel. **Parasites & Vectors**, v. 1, n. 1, p. 11, 2008.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996. p. 190-192.

VALADAS, S. et al. Occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum*, anti-*Toxoplasma gondii*, and anti-*Leishmania chagasi* in serum of dogs from Pará State, Amazon, Brazil. **Parasitology research**, v. 107, n. 2, p. 453–7, July. 2010.

VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D. E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. **Journal of clinical pathology**, v. 31, n. 6, p. 507–20, June. 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **HIV/AIDS**. Geneva, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/hiv/en/> Acesso em 15 Abril 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **Leishmaniasis**. Geneva, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> Acesso em 15 Abril de 2015.

ZANETTE, M. F. et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum* *chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 105–107, Feb. 2014.

ZIJLSTRA, E. E. et al. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 5, p. 505–7, Jan. 1992.

ZIJLSTRA, E. E. et al. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 5, n. 5, p. 717–20, Sept. 1998.

ZUBEN, A. P. B. VON et al. The first canine visceral leishmaniasis outbreak in Campinas, State of São Paulo Southeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 385–388, June.

ANEXO

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 06 de maio de 2013.

Prof. Marcos José Marques

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 507/2013, intitulado “Inquérito sorológico-epidemiológico de leishmaniose visceral canina no município de Alfenas-MG” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.



Prof Dr Carlos Giovani de Oliveira Nascimento
Presidente da CEUA – Unifal-MG