

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

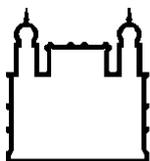
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical - Mestrado

**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL E COMPARATIVO ATRAVÉS DE
MÉTODOS SOROLÓGICOS E MOLECULARES DA INFECCÃO POR
LEISHMANIA SPP. EM CÃES RESIDENTES NA REGIÃO OCEÂNICA DE
ITAIPU, MUNICÍPIO DE NITERÓI, RIO DE JANEIRO.**

Monique Ferreira Portella

Rio de Janeiro

Mai de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Monique Ferreira Portella

**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL E COMPARATIVO ATRAVÉS DE
MÉTODOS SOROLÓGICOS E MOLECULARES DA INFECÇÃO POR
LEISHMANIA SPP. EM CÃES RESIDENTES NA REGIÃO OCEÂNICA DE
ITAIPU, MUNICÍPIO DE NITERÓI, RIO DE JANEIRO.**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo
Cruz como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Medicina Tropical

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil

Co-Orientador: Prof. Dr. Cristian Ferreira de Souza

RIO DE JANEIRO

Mai de 2018

Portella, Monique Ferreira.

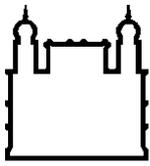
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL E COMPARATIVO ATRAVÉS DE MÉTODOS SOROLÓGICOS E MOLECULARES DA INFECÇÃO POR LEISHMANIA SPP. EM CÃES RESIDENTES NA REGIÃO OCEÂNICA DE ITAIPU, MUNICÍPIO DE NITERÓI, RIO DE JANEIRO./MoniqueFerreira Portella. - Rio de janeiro, 2018.

XIII,61F f.; il.

Dissertação(Mestrado)–InstitutoOswaldoCruz,Pós-Graduaçãoem Medicina Tropical, 2018.

Orientador: Reginaldo Peçanha Brazil.

Co-orientador: Cristian Ferreira de Souza.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTORA: *Monique Ferreira Portella*

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL E COMPARATIVO ATRAVÉS DE MÉTODOS SOROLÓGICOS E MOLECULARES DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA SPP.* EM CÃES RESIDENTES NA REGIÃO OCEÂNICA DE ITAIPU, MUNICÍPIO DE NITERÓI, RIO DE JANEIRO.

Orientador: Prof. Doutor Reginaldo Peçanha Brazil

Co orientador: Prof. Doutor Cristian Ferreira de Souza

Banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Mauricio Luiz Vilela – IOC/FIOCRUZ (Presidente e revisor)

Prof. Dr. Marcelo Salabert Gonzalez – UFF/RJ

Profa.Dra. Kátia da Silva Calabrese – IOC/FIOCRUZ

Profa.Dra. Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues – IOC/FIOCRUZ (suplente)

Profa.Dra. Thaís de Araújo Pereira – IOC/FIOCRUZ (Suplente)

Aprovada em: 29 de Maio de 2018.

Rio de Janeiro, 29 de Maio de 2018.

“A persistência é o caminho do êxito.”

(CHARLES CHAPLIN)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela perseverança nos momentos de dificuldade e pela força nas horas de desânimo e cansaço;

À minha família sempre ao meu lado com muito amor e apoio, Pais, marido, filha.

Ao mestre, Dr. Reginaldo Brazil, por ter me acolhido como orientanda após longo período sem orientação e a oportunidade de aprender com suas experiências e ensinamentos. Obrigada pela pessoa e mestre que é.

Ao Dr. Cristian Ferreira de Souza, por aceitar ser o coorientador do estudo, ajudando e proporcionando o aprendizado científico na prática, no apoio das técnicas e nos esclarecimentos de Biologia Molecular e acúmulo de experiências;

À médica veterinária Caroline Magalhães Cunha, pela colaboração, atenção e ajuda em todo o processo de coletas das amostras sendo de suma importância para o estudo e à toda equipe da Clínica HealthVeterinary Center que de alguma forma participaram e ajudaram no decorrer do estudo em especial a secretária da clínica Luana, que tanto me ajudou com a coleta dos dados;

À colega de Laboratório Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues, pelo apoio, ajuda e orientações em momentos importantes;

À Thaís A. Pereira, do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas-LABIMDOE - no apoio às técnicas e nos esclarecimentos sobre biologia molecular;

À amiga Thamiris Baltazar, da minha turma de mestrado por ter me auxiliado na compilação dos dados e resultados finais.

A todos os meus amigos que estão ao meu lado há muitos anos, me acompanhando, incentivando e torcendo, em especial Luciana Gomes Fialho e Társila Freitas.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, seus professores e pesquisadores pelos preciosos ensinamentos e conselhos. Aos funcionários pela atenção e dedicação;

Ao Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz pelo suporte na realização deste trabalho; A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, incluído na Ordem Kinetoplastea, Família Trypanosomatidae. São protozoários heteroxênicos e parasitas intracelulares obrigatórios. A doença no Continente Americano apresenta duas formas clínicas básicas: a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a Leishmaniose Visceral (LV). Diferentes espécies de mamíferos são incriminadas como possíveis reservatórios naturais do parasita, e dentre os animais domésticos envolvidos no ciclo de transmissão das leishmanias, o cão (*Canis familiaris*), apresenta papel relevante. Segundo a Organização Mundial da Saúde, as leishmanioses ocorrem em quatro continentes afetando principalmente populações pobres na África, Ásia e América Latina; são consideradas endêmicas em 98 países e no Brasil têm se expandido geograficamente. Em relação ao reservatório doméstico, as alterações clínicas podem ser confundidas entre si, revelando grande impacto no contexto da doença, e por isso, é importante um diagnóstico seguro para uma notificação precisa dos casos, resultando ações efetivas nos programas de controle, evitando a eutanásia desnecessária. O presente estudo teve como objetivo diagnosticar *Leishmania* spp. nas amostras de sangue coletadas de cães residentes da Região Oceânica de Itaipu, Município de Niterói/RJ, onde já foi constatada a circulação de algumas espécies de flebotomíneos consideradas vetoras de *Leishmania*, e confrontar o teste imunocromatográfico rápido, DPP, com o PCR, utilizando diferentes alvos intergênicos (ITS1 e kDNA) além de PCR(HPS70), para acurar a espécie de *Leishmania* spp. causadora da infecção nas amostras positivas. Os testes DPP e PCR(ITS1) foram realizados em todas as amostras e o PCR(kDNA) e PCR(HPS70) apenas nas amostras positivas para algum dos testes anteriores. Foram realizadas coletas com um total de 174 amostras de sangue de cães, compreendendo diferentes idades, raças e sexos e dessas amostras, cinco foram positivas, das quais, quatro positivas para o teste de DPP (2,29%) e uma pelo PCR utilizando o alvo intergênico ITS1. O PCR com o uso do alvo intergênico o kDNA, teve sensibilidade de 100% quando utilizado para confirmação das quatro positivities demonstradas pelo teste DPP e também pela positividade demonstrada pelo PCR(ITS1). Embora os resultados do presente estudo apontem para a inexistência da doença ativa entre os 169 animais examinados, o encontro de quatro animais sororreagentes e uma positividade no PCR indica um provável contato com o parasita. Tal fato deve ser considerado em futuros inquéritos na região e em suas adjacências.

ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by protozoa of the genus *Leishmania*, included in the Order Kinetoplastida, Family Trypanosomatidae. They are heteroxenic protozoa and obligate intracellular parasites. The disease is observed in the Americas as Cutaneous Leishmaniasis (ACL) and Visceral Leishmaniasis (LV). Different species of mammals are considered as potential natural reservoirs of the parasite, and of the domestic animals involved in the transmission cycle of leishmaniasis, the dog (*Canis familiaris*) plays a relevant role. According to the World Health Organization, as leishmaniasis occurs on four continents, populations are found in Africa, Asia and Latin America; Considered endemic in 98 countries and in Brazil they have expanded geographically. Regarding the domestic reservoir, the clinical forms can be confused, they have a great impact in the context of the disease, so a correct diagnosis for a demand situation is important, and they allow effective results in the control programs, thus avoiding a unnecessary euthanasia. The main objective of this study was to diagnose *Leishmania* spp. in the blood samples collected from dogs resident in the Itaipu Ocean Region, in the city of Niterói, RJ, where some species of sandflies had been considered vectors of *Leishmania*, confronting the rapid immunochromatographic test, DPP with molecular tests (PCR) using different intergenic targets (ITS1 and kDNA) besides PCR (HPS70) to identify the species of *Leishmania* responsible for the infection in the positive samples. The DPP and PCR (ITS1) tests were performed on all samples and the PCR (kDNA) and PCR (HPS70) only on positive samples for some of the previous tests. A total of 174 blood samples from dogs, comprising different ages, races and sexes, were collected, 5 were positive ;, 4 positive for the DPP test (2.29%) and only one by the PCR test using the ITS1 intergenic target, which did not confirm positivity in any of the samples considered positive by DPP. The PCR using the kDNA as an intergenic target had a sensitivity of 100% when used to confirm the four positive demonstrated by the DPP test and also by the positivity demonstrated by the PCR (ITS1). Although the results of the present study point to the lack of active disease among the 169 animals examined, the finding of 4 seroreagent animals and a PCR positivity indicate a probable contact with the parasite. This fact should be considered in future surveys in the region and its surroundings.

ÍNDICE:

RESUMO:	VI
ABSTRACT:	VII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 LEISHMANIOSES.....	1
1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL.....	4
1.3 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	6
1.4 LEISHMANIOSE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.....	7
2. QUADRO CLÍNICO	10
3. DIAGNÓSTICO	11
4. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	16
4.1 OBJETIVO GERAL	16
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	16
5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	17
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
6.1 ÁREA DE ESTUDO.....	18
6.2 AMOSTRA DE CÃES E COLETA SANGUÍNEA	21
6.3 TESTES DIAGNÓSTICOS.....	22
6.3.1 TESTE RÁPIDO IMUNOCROMATOGRÁFICO DPP® (DUAL PATH PLATFORM).....	22
6.3.2 TESTE MOLECULAR	23
6.3.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE SANGUE COLETADAS.....	23
6.3.2.2 PCR - ALVO INTERGÊNICO ITS1 - PARA VERIFICAR A INFECÇÃO NATURAL POR <i>LEISHMANIA</i> SPP. NAS AMOSTRAS COLETADAS	24
6.3.2.3 PCR - ALVO INTERGÊNICO kDNA - PARA VERIFICAR A INFECÇÃO NATURAL POR <i>LEISHMANIA</i> SPP. NAS AMOSTRAS COLETADAS	25
6.3.2.4 PCR - ALVO INTERGÊNICO HSP70 - PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i> PROVENIENTE DAS AMOSTRAS POSITIVAS	26
6.3.2.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	27
7. RESULTADOS	28
8. DISCUSSÃO:.....	35
9. CONCLUSÃO:.....	38
10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	39
11. ANEXO	57
11.1 TCLE.....	57
11.2 CEUA.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS:

FIGURA 1. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	2
FIGURA 2. Clínica Health Veterinary Center onde foram realizadas as coletas de amostras do presente estudo	18
FIGURA 3. Regiões Administrativas do Município de Niterói/ Rio de Janeiro	20
FIGURA4. Localização da Clínica Veterinária Health Veterinary Center.....	21
FIGURA5. Coleta sanguínea dos cães residentes em Itaipu, Região Oceânica de Niterói, analisados no estudo, na Clínica Veterinária Health Veterinary Center. Período março a agosto de 2017.....	22
FIGURA 6. Figura ilustrativa da Região intergênica do ITS1.....	24
FIGURA 7. Porcentagem de acordo com idade dos cães analisados no estudo.....	28
FIGURA 8. Porcentagem de acordo com a raça dos cães analisados no estudo.....	29
FIGURA 9. Porcentagem de acordo com sexo dos cães analisados no estudo.....	29
FIGURA 10. Teste DPP demonstrativo da pesquisa de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp em sangue coletado de cães residentes em Itaipu, Região Oceânica do Município de Niterói/RJ, atendidos na Clínica Veterinária Health Veterinary, 2017. Teste positivo pela observação de duas bandas, uma referente ao controle do teste (C) e outra referente à amostra testada (T), indicado pela seta.....	30
FIGURA 11. Gel demonstrativo da pesquisa de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. em sangue coletado de cães residentes em Itaipu, Região Oceânica do Município de Niterói/RJ, atendidos na Clínica Veterinária Health Veterinary, 2017. Utilização do ITS1 como alvo intergênico. Gel de agarose 2% corado com gel Red. PM: marcador de pares de base (100pb); C-: Controle negativo (água pura livre de DNA); C+: controle positivo DNA de cultura de <i>Leishmania</i> spp. (MHOM/BR/75/M2903); Gel demonstrando 7 amostras sendo a amostra de número 5 considerada positiva.....	30
FIGURA 12. Gel demonstrativo da pesquisa de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. em sangue coletado de cães residentes em Itaipu, Região Oceânica do Município de Niterói/RJ, atendidos na Clínica Veterinária Health Veterinary, 2017 cuja positividade foi detectada em um dos testes anteriores.Utilização do kDNA como alvo intergênico. Gel de agarose 2% corado com gel Red. PM: marcador de pares de base (120pb); C-: Controle negativo (água pura livre de DNA); C+: controle positivo DNA de cultura de <i>Leishmania</i> spp. (MHOM/BR/75/M2903) CE: Controle negativo da extração. Gel demonstrando positivities nas 5 amostras testadas.....	31
FIGURA 13: Total de positivities de acordo com o teste utilizado – 4 amostras consideradas positivas pelo teste DPP e apenas uma pelo PCR(ITS1), todas as positivities foram confirmadas pelo PCR(kDNA). PCR(HSP70) não foi sensível para detectar nenhuma banda nas amostras analisadas.....	31
FIGURA 14: Gráfico das raças que obtiveram positividade de acordo com o teste DPP utilizado no estudo.....	32
FIGURA 15: Gráfico das raças que obtiveram positividade de acordo com o teste PCR(ITS1) utilizado no estudo.....	32
FIGURA16. Gráfico das idades que obtiveram positividade de acordo com o teste PCR(ITS1) utilizado no estudo.....	33

FIGURA 17. Gráfico das idades que obtiveram positividade de acordo com o teste PCR(ITS1) utilizado no estudo..... 33

LISTA DE TABELAS:

TABELA 1: Número de casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar no município de Niterói/RJ, Brasil, entre 2007e2015 9

TABELA 2: Número de casos confirmados de Leishmaniose visceral no município de Niterói entre os anosde2007-2015..... 9

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DPP – Teste Dual Path Plataform;

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay;

IFI – IndirectImmunofluorescence

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana;

LV – Leishmaniose Visceral;

MS – Ministério da Saúde;

OMS – Organização Mundial da Saúde;

OPAS – Organização Pan Americana da Saúde;

PCR – Polymerase Chain Reaction

SRD – Sem raçadefinida.

WHO - World Health Organization

1. Introdução

As leishmanioses são doenças parasitárias tropicais negligenciadas associadas a alta morbidade e mortalidade, ocorrendo em quatro continentes afetando principalmente populações pobres na África, Ásia e América Latina e consideradas endêmica em 98 países. (Alvar et al 2012; WHO, 2018). Apresentam as seguintes formas clínicas: leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea e leishmaniose cutânea mucosa (WHO, 2018). No Continente Americano podemos atribuir a seguinte denominação: leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA) (Pontes, 2008).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 1,3 milhões de novos casos de leishmanioses ocorram todo ano . O Brasil é um dos seis países que concentram mais de 90% das pessoas com leishmaniose visceral, a forma mais grave e fatal da doença (WHO, 2016). De acordo com Ministério da Saúde do Brasil, de 2000 a 2016, 398.103 casos de leishmaniose tegumentar Americana(LTA) e 58 300 casos de leishmaniose visceral (VL) foram notificados no Brasil (SINAN, 2017).

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), gênero incluído na Ordem kinetoplastea (D'avila – Lery et al. 2015), Família Trypanosomatidae (Doflein, 1901; Woodcock, 1906). São protozoários heteroxênicos e parasitas intracelulares obrigatórios apresentando as formas amastigotas – com flagelo recorrente, imóveis e encontradas no interior de células do sistema fagocítico mononuclear de vertebrados, e as formas promastigotas - flageladas localizadas no trato digestivo do inseto vetor (Miranda et al.2007).

As espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas, insetos dípteros pertencentes a Família Psychodidae e a subfamília Phlebotominae.e aos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (Young & Duncan, 1994).

O ciclo do parasita tem a participação de um hospedeiro vertebrado e um hospedeiro invertebrado, o flebotomíneo (Carvalho, 2008).A transmissão da *Leishmania* ocorre quando a fêmea do flebotomíneo infectada pica o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, inoculando formas promastigotas que são fagocitadas por macrófagos e outras células do sistema mononuclear fagocitário e se transformam em formas amastigotas. O parasita se

desenvolve e se multiplica por divisão binária, e infecta outras células do sistema mononuclear fagocitário (Nieves& Pimenta, 2000; CDC, 2015).

Nas fêmeas de flebotomíneos, o parasitanão se encontra no meio intracelular e sim na luz do trato digestivo, onde as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo se diferenciam morfológica e bioquimicamente em formas flageladas, as formas promastigotas, são posteriormente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada. (Gontijo & Carvalho,2003)

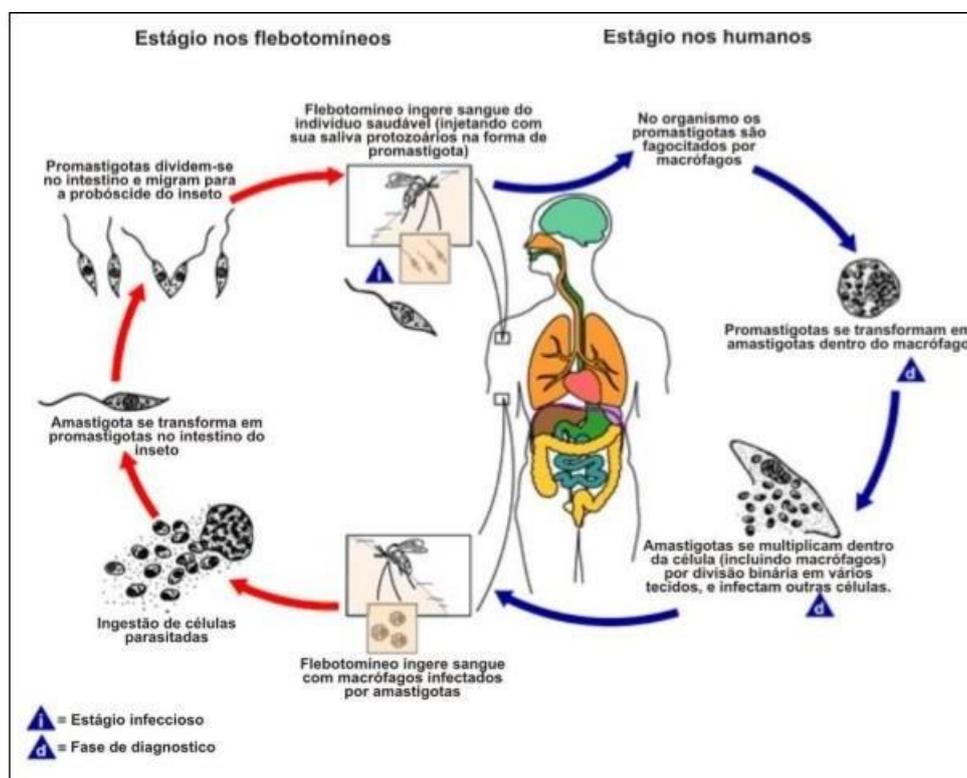


Figura 1: Ciclo biológico da *Leishmania* spp. Fonte: adaptado de CDC 2015.

Dentre as quinze espécies de *Leishmania* que infectam o homem nas Américas, treze tem natureza zoonótica, e causam as formas cutânea, mucocutânea e visceral, podendo acometer um diverso número de espécies de mamíferos, incluindo o homem (Brazil et al. 2014).

Os reservatórios do parasita *Leishmania* podem ser desde animais silvestres, como roedores silvestres, marsupiais, edentados e canídeos silvestres (Nery Guimarães et al.1968;

Sherlock et al.1984; Oliveira et al. 2005; Quaresma et al.2011) à animais domésticos tais como: suínos (Brazil et al. 1987), felinos (Pennisi et al. 2004; Souza, 2005) e equinos (Aguilar et al. 1986).

Dentre esses animais domésticos incriminados como reservatórios (LV) e possíveis reservatórios (LT) , o cão (*Canis familiaris*) possui papel relevante, já que tem sido encontrado naturalmente infectado por diferentes espécies de *Leishmanias* tais como *L. braziliensis* e *L. amazonenses*, *L. infantum* (Figueiredo & Madeira, 2014).

A leishmaniose canina, é um problema de saúde pública em diferentes países, inclusive no Brasil, nos quais os cães são considerados o principal hospedeiro doméstico para a infecção humana de LVA (Albuquerque et al. 2017), Esses animais são altamente suscetíveis à infecção e representam importante fonte de infecção por causa do intenso parasitismo da pele nessa forma clínica da doença. (Molina et al. 1994; Giunchetti et al. 2006). A leishmaniose visceral canina é considerada emergente e reemergente, como indica o aumento no número de cães soropositivos e pela expansão geográfica da doença (Fraga et al. 2012; Coura-Vital et al, 2014).

Em relação à participação dos cães enquanto reservatório doméstico do agente da leishmaniose visceral, seu papel já é conhecido através de evidências epidemiológicas e experimentais, que apontam os cães como o principal hospedeiro reservatório de *Leishmania (Leishmania) infantum* em ambientes urbanos (Dantas-Torres, 2007). Por outro lado, não se pode afirmar que atuem também como reservatórios na transmissão dos agentes da leishmaniose tegumentar americana, uma vez que não há evidências científicas suficientes que comprovem tal argumento (Gontijo et al.2002; Madeira et al.2003).

Contudo, a constatação da leishmaniose tegumentar canina sob as formas sintomática e subclínica, em regiões onde também ocorreram concomitantemente casos humanos, sugere que o cão possa representar algum papel na cadeia de transmissão da LTA (Madeira et al.2006). Outra evidência circunstancial que sugere que os cães atuem como reservatórios da leishmaniose tegumentar é baseada em estudos em que a *Leishmania* isolada de seres humanos e cães se mostraram idênticas (Reithinger& Davies, 1999) e nas últimas décadas, muitos relatos de infecção natural de cães por *Leishmania braziliensis* já foram descritos (Fenech 1997; Reithinger& Davies, 1999; Gontijo et al. 2002; Madeira et al., 2003, 2006; Ryan et al. 2003; Castro et al. 2007; Massunari et al. 2009), contudo a capacidade de infectar

flebotomíneos parece ser baixa (Travi et al. 2006). Tais argumentos torna importante investigar a infecção por *Leishmania* ssp. em cães (Pittner et al.2009).

1.1– Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral é a apresentação clínica mais grave da infecção. Trata-se de uma doença crônica potencialmente fatal quando não se institui o tratamento adequado (Gontijo & Melo, 2004). É caracterizada por febre irregular de intensidade média e de longa duração e acometimento de órgãos, podendo causar hepatomegalia e esplenomegalia (Pontes, 2008). Nesta forma, os parasitos visceralizam para o fígado e o baço.. No Brasil, a doença é causada pela espécie *L. infantum* e tem sido alvo de especial atenção nas últimas décadas, devido ao processo de urbanização identificado a partir da década de 90, durante o surto ocorrida em Teresina (Costa et al 1990).

A LV é considerada endêmica em 76 países, e estima-se que entre 200 mil e 400 mil casos da doença ocorram a cada ano no mundo (PAHO-WHO,2018) . É altamente endêmica no subcontinente indiano e na África Oriental. No mundo, mais de 90% dos novos casos notificados ocorreram em 6 países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. (WHO, 2016).

Segundo a PAHO-WHO (2018), ja foram descritos pelo menos 12 países da América Latina com LV, sendo que 96% dos casos ocorreram no Brasil. Neste contexto, regionalmente podemos classificar a LV em três cenários epidemiológicos:

- Países com transmissão em expansão [Argentina, Brasil e Paraguai];
- Países com transmissão estável ou controlada [Colômbia e Venezuela];
- Países com transmissão esporádica [Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia, Guiana e México](PAHO-WHO,2018).

O primeiro relato de LV no Brasil foi feito em 1934, quando foram encontradas amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígado de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela. Chagas (1936) diagnosticou, nos estados do Ceará e Sergipe, os primeiros casos autóctone no Brasil. Investigações sobre os reservatórios e vetores efetuados no estado do Ceará, revelaram dados epidemiológicos de grande relevância em ambiente onde ocorria o primeiro surto da leishmaniose visceral no Brasil (Deane, 1956).

Antes descrita como uma epidemia restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro, em meados dos anos oitenta, houve uma constatação na transformação do padrão epidemiológico, quando a LV avançou para regiões indenes alcançando a periferia de grandes centros urbanos (MS,2015; Gontijo & Melo, 2004; Rangel: Vilela, 2008). Desde então, a transmissão está em franca expansão no Brasil, ocorrendo endemicamente em estados das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Nunes, 2015). A expansão para áreas urbanas das cidades de médio e grande porte foi principalmente observada nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. Na década de 1990 apenas 10% dos casos ocorriam fora da região nordeste, mas em 2010 mais que a metade dos casos foi registrada em outras regiões (Werneck, 2010). A urbanização da LV é uma crescente preocupação para a saúde pública. Segundo o Ministério da Saúde, entre 2010 e 2015 foram confirmados 6815 casos de LV no país, sendo que em 2015, a região Nordeste registrou o maior número de casos de LV (1.806); seguida pelas regiões Sudeste (538); Norte (469); Centro Oeste (157); e Sul (MS, 2015).

As interferências antrópicas causadas pelo aumento da densidade populacional humana nas periferias dos municípios de grande e médio porte do país, decorrentes da migração, resultou na construção de moradias com condições sanitárias precária próximas a áreas de vegetação, o que proporcionou em um maior contato entre indivíduos susceptíveis e flebotomíneos vetores, possibilitando o surgimento de casos humanos da doença, que certamente tiveram impacto no processo de urbanização da LV (Rangel & Vilela, 2008). Vale destacar que diante dessas circunstâncias, não se pode deixar de considerar a importância do cão como reservatório doméstico do parasita (Jorge et al. 2010; Souza et al. 2010).

Nos cães a LV pode se manifestar de várias formas, em função da raça, idade e mesmo sistema nutricional, mas vai depender, principalmente, da imunidade do animal. Geralmente, a doença no cão é sistêmica e crônica, de evolução lenta e início insidioso (Brasil, 2006).

Em relação às espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão da LV no Brasil, a mais importante delas é a *Lutzomyia longipalpis*, que tem uma distribuição geográfica ampla, sendo encontrada em todas as regiões geográficas do Brasil, e é sabidamente o principal vetor no Continente Americano (Deane, 1956; Lainson & Rangel, 2006). Outra espécie, *L. cruzi*, está relacionada à transmissão nos estados de Mato Grosso do Sul (Santos et al. 1998) e Mato Grosso (Missawa et al 2011), e mais recentemente, foi sugerida a participação de *Migonemyia migonei* situação descrita em São Vicente Férrer no estado de Pernambuco (Carvalho et al 2010).

1.2– Leishmaniose Tegumentar

Na leishmaniose tegumentar, a doença tem caráter zoonótico e dependendo da espécie do parasita, os indivíduos acometidos podem apresentar lesão cutânea e mucocutânea (Gontijo & Carvalho, 2003). É considerada uma enfermidade polimórfica e espectral da pele e mucosas, com manifestações desde formas cutâneas, caracterizada por lesões ulcerosas, indolores, únicas ou múltiplas; as formas cutâneo-mucosa é caracterizada por lesões mucosas agressivas que afetam as regiões nasofaríngeanas e a forma cutâneo-difusa com lesões nodulares não-ulceradas (Pontes, 2008). Trata-se de uma doença antiga com relatos e descrição na literatura desde o século I d.C. na Ásia Central ao norte do Afeganistão, onde era conhecida como “Úlcera de Balkh”. Os primeiros registros nas Américas foram em cerâmicas pré-colombianas, entre 400-900 anos d.C., feitas pelos Mochicas do Peru, no qual apresentava imagens humanas com mutilações de lábios e nariz, caracterizando os sintomas da leishmaniose cutâneo-mucosa. Através de estudos de paleomedicina, foram descobertas múmias com lesões de pele e mucosas característica primordial da leishmaniose (Santos & Coimbra, 1994).

A primeira confirmação de um caso de leishmaniose com lesões cutâneas e nasofaríngeanas no Brasil, se deu na cidade de Bauru, interior do estado de São Paulo em 1909 por Lindenberg, que encontrou formas do parasita, idênticas à *Leishmania tropica*, um dos agentes da leishmaniose cutânea do Velho Mundo, em indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do estado (Basano & Camargo, 2013). Em 1911, Gaspar Vianna, observou no material estudado diferenças e considerou o parasito diferente de *L. tropica*, e nomeou como *Leishmania braziliensis*, ficando assim denominado o agente etiológico da "úlcer de Bauru", "ferida brava" ou "nariz de tapir", nomes populares dados à doença na época (Silveira et al. 1997).

Na leishmaniose cutânea cerca de 95% dos casos ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central; mais de dois terços dos novos casos ocorrem em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria. Anualmente, ocorrem de 700 mil a 1,3 milhão de novos casos em todo o mundo (WHO, 2016), e encontra-se em franca expansão geográfica, sendo que no início da década de 80, haviam sido registrados casos autóctones em apenas 19 estados e, em 2003, foi confirmada autoctonia em todas as unidades federativas do país (MS, 2015).

No Brasil, o Ministério da Saúde registrou uma média anual de 26 mil novos casos de LT e em 2017, a região Norte registrou o maior número de casos (8.939) seguida do Nordeste (5.152), Centro-Oeste (2.937), Sudeste (1.762) e Sul (493). (MS, 2017).

As espécies do parasita que causam as diferentes formas clínicas de LTA no Brasil, são: *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L.(V) shawi*, *L.(V.) lindenbergi*, (Lainson, 1988; Silveira et al. 2002; Sharma& Singh, 2008; Rangel &Lainson, 2009). A espécie com maior distribuição e a principal causadora da doença no país é a *L. (V.) braziliensis* (Brazil et al.2015).

Em relação às espécies de flebotomíneos responsáveis pela transmissão do parasito causador da LTA no Brasil, temos: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia umbratilis*, *Nyssomyia intermedia*, *Psychodopygus wellcomei* e *Migonemyia migonei* (Aguiar & Medeiros, 2003; Souza et al. 2009, Rangel & Laison, 2009).

1.3– Leishmaniose no Estado do Rio de Janeiro

A leishmaniose tegumentar ocorre em praticamente todo o Estado do Rio de Janeiro principalmente, em áreas rurais e apresenta um caráter de transmissão peridomiciliar, provocado principalmente pela adaptação do inseto vetor aos ambientes naturais modificados, acarretando, dessa forma o envolvimento de animais domésticos no ciclo de transmissão (Brazil et al. 1991; Marzochi&Marzochi, 1994; Madeira et al. 2006).

Quanto à leishmaniose visceral, o Estado do Rio de Janeiro está classificado também como área de transmissão esporádica, com casos humanos e caninos diagnosticados no município do Rio de Janeiro, assim como, Angra dos Reis e Mangaratiba (Madeira et al. 2006).

A partir de 2007 até início de 2013 foram diagnosticados 25 casos de leishmaniose visceral humana no Estado,e mais recentemente, casos autóctones foram registrados nos municípios de Rio de Janeiro, Barra Mansa e Volta Redonda, demonstrando a expansão da doença para diversas regiões do Estado (MS, 2012), inclusive Niterói e Maricá em que estudos realizados em 2015 no Bairro de Jacaré, Região Oceânica de Niterói/RJ, para avaliar a infecção em cães, onde foram detectados 17 casos de leishmaniose visceral entre os 110 animais avaliados, com uma prevalência de 15,5% (Oliveira et al. 2013, 2015).

Outro estudo realizado também em cães do Município de Maricá/RJ, visando a infecção ativa para LTA, foi visto que, de oito cães que apresentavam lesões sugestivas, três tiveram isolamento positivo e 24,5% apresentaram reatividade, estando associado ao isolamento (Uchôa et al. 2001).

Reforçando essa indicação, dados do Centro de Controle de Zoonoses de Niterói mostraram a presença de cães sorologicamente positivos para leishmaniose Visceral na região (Madeira et al. 2000) e até início de 2014, foram notificados 38 caninos positivos para Leishmaniose Visceral Canina. A investigação e notificação de casos de LVC tem aumentado significativamente no município de Niterói (Nunes et al. 2015).

Além dos casos caninos acima, dados do Ministério da saúde demonstram casos da doença em humanos na região em que foram confirmados 8 casos de leishmaniose tegumentar humana entre os anos de 2007 e 2015, e um caso de leishmaniose visceral humana entre 2007 e 2015 no município de Niterói, conforme tabelas 1 e 2 (Brasil, 2017).

Esses dados indicam situação de transmissão contínua das leishmanioses canina e humana na área e demonstra a importância de um estudo na região.

O primeiro caso de leishmaniose visceral canina autóctone em Niterói foi descrito em 2009 por De Paula et al. 2009), tendo sido realizado o primeiro inquérito sorológico no entorno deste caso índice em 2011, encontrando-se prevalência de 15,5% de acordo com o protocolo diagnóstico então recomendado pelo Ministério da Saúde: Ensaio imunoenzimático como teste de triagem e Reação de Imunofluorescência Indireta com titulação $\geq 1:40$ como confirmatório (Oliveira et al. 2015).

Tabela 1: Número de casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar no município de Niterói/RJ, Brasil, entre 2007 e 2015.

Ano	Nº casos de LT confirmados em Niterói
2007	2
2009	2
2012	1
2013	1
2014	1
2015	1
Total	8

Fonte: Datasus 2017– Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde.

Tabela 2: Número de casos confirmados de Leishmaniose visceral no município de Niterói entre os anos de 2007-2015.

Ano	Nº casos de LV confirmados em Niterói
2007	1
2009	0
2012	0
2013	0
2014	0
2015	0
Total	1

Fonte: Datasus 2017- Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde.

2– Quadro Clínico

Na leishmaniose visceral as manifestações clínicas tanto no cão quanto no homem são similares e apresentam sinais inespecíficos, como febre irregular por longos períodos, anemia, perda progressiva de peso e caquexia em seu estágio final (Alvar et al. 2004).

O reservatório canino pode apresentar desde aparente estado sadio (assintomático) a quadros severos de caquexia associada a outras complicações. Os sinais clínicos mais relatados na literatura são as alterações cutâneas, sinais oculares, alterações cervicais, emagrecimento, anemias, febre, alongamento das unhas (onicogribose), edema do focinho, paresia das patas posteriores podendo alcançar órgãos causando, por exemplo, hepatoesplenomegalia (Figueiredo & Madeira, 2014). Alguns autores mostram que cães infectados, mesmo assintomáticos, são fontes do parasito para o vetor, sugerindo um papel ativo destes cães na transmissão da *Leishmania*. (Molina et al.1994; Guarga et al. 2000).

Na leishmaniose tegumentar canina as manifestações se dão através de lesões cutâneas simples que podem cicatrizar espontaneamente, bem como lesões de mucosa. (Brazil & Brazil, 2014).

As alterações clínicas nos dois agravos podem ser confundidas entre si, assim é importante um diagnóstico correto e seguro da doença (Brazil & Brazil, 2014) que proporcione uma notificação eficaz dos casos e tenham impacto nas estratégias empregadas nos programas de controle.

No Brasil, as ações do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, do Ministério da Saúde, estão focadas na diminuição da morbidade e letalidade, e no controle do reservatório canino, dos vetores e nas atividades de educação em saúde. As ações referentes ao cão preconizam a eutanásia dos animais infectados (Brasil, 2006). Assim, a perspectiva de um diagnóstico diferencial e com reconhecida eficácia pode, nesta perspectiva, evitar a eutanásia de animais.

Cabe destacar que mais recentemente, por meio de Nota Técnica conjunta assinada pelo Ministério da Agricultura e pelo Ministério da Saúde, foi autorizado em 2016 sob o número 001/2016 o registro do produto MILTEFORAN indicado para o tratamento da leishmaniose visceral em cães. Porém, o tratamento não configura uma medida de saúde pública para controle da doença (MS-Nota técnica, 2016).

3–Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose canina é baseado em sinais clínicos, dados epidemiológicos e diagnóstico laboratorial (Brasil, 2006). O diagnóstico ainda representa um desafio uma vez que a sintomatologia pode ser polimórfica e semelhante a outras doenças, já que a resposta imune do hospedeiro, a espécie envolvida e a complexa relação parasito-hospedeiro são responsáveis pela produção dessas variações que dificultam o diagnóstico, apesar dos progressos realizados no desenvolvimento de vários métodos diretos e indiretos (Maia & Campino, 2008).

De acordo com o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde (Brasil, 2006) a inexistência de um teste sorológico específico e sensível contribuiu para o surgimento de problemas nas unidades de saúde pública, e também, para alegação por parte dos profissionais médicos veterinários e proprietários de cães contestarem a eutanásia dos animais soropositivos (Alves & Belvilacqua, 2004). Por essas razões, a expectativa por métodos de diagnóstico precisos, de fácil realização e interpretação e que forneçam resultados rápidos têm sido cada vez mais desejados. (Dourado et al.2007). No diagnóstico laboratorial, além dos métodos parasitológicos, os ensaios sorológicos: IFI, ELISA, teste rápido imunocromatográfico, e os testes moleculares têm sido utilizados. (Leal, 2009).

De acordo com Romero e Boelaert (2010), as técnicas parasitológicas são altamente específicas, mas sua sensibilidade varia de acordo com o tipo de tecido, além de requererem experiência laboral, sendo a sensibilidade mais alta alcançada em aspirado de baço (Dishet al; 2003). É importante ressaltar que essa técnica apresenta limitações tanto na sensibilidade quanto por dificuldades técnicas ou operacionais. (Leal, 2009).

Em contrapartida, diferentes técnicas sorológicas têm sido utilizadas no diagnóstico da leishmaniose humana e canina. Os testes diferem em sua sensibilidade e especificidade, na sua aplicação prática, nas condições de campo e na disponibilidade de reagentes (Gontijo & Melo, 2004).

Segundo Mittler et al.(2005), o ELISA tem sido capaz de detectar animais sororreagentes tanto naqueles com e sem sinais clínicos, enquanto o IFI detecta maior parcela de animais com manifestação clínica aparente. Parte das dificuldades de diagnóstico diz respeito à sensibilidade e especificidade desses testes. A sensibilidade dos mesmos é bastante

discutível, não havendo concordância entre testes parasitológicos, imunohistológico e sorológicos. (Cabrera et al.2003).

Dentre as tecnologias para o diagnóstico, podemos elencar o teste rápido Dual Path Plataform (TR - DPP® - leishmaniose visceral canina) para diagnóstico e triagem da leishmaniose visceral. Desenvolvido pelo Instituto de Biomanguinhos, tem vantagens como fácil armazenamento, diagnóstico rápido, facilidade de uso e flexibilidade no tipo de amostras biológicas utilizadas (sangue total, soro ou plasma). (Coura-Vital et al.2014). Trata-se de um ensaio imunocromático de triagem que emprega de um lado, a combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal, e de outro, antígenos recombinantes rk28 (fusão da rk9, rk26 e rk39) específicos de *Leishmania* ligados à uma membrana de nitrocelulose. Se houver a presença de anticorpos anti-*Leishmania* na amostra testada, estas reagirão com os antígenos recombinantes, e em sequência, se ligarão à combinação de proteína A e ouro coloidal, fornecendo o resultado positivo por meio de reação de cor (Biomanguinhos, 2011). Segundo Nota Técnica do Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis de 2011, o teste rápido imunocromático - TR - DPP® passaria a ser o teste de triagem nos inquéritos caninos (Brasil, 2011).

Outra ferramenta muito útil no diagnóstico das leishmanioses utilizada na pesquisa e que tem sido desenvolvida nos últimos vinte anos, é o método molecular baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR) para a identificação de algumas espécies de *Leishmania* e atualmente é a técnica mais utilizada (Oliveira et al. 2015) e tem apresentado maior sensibilidade quando comparada às técnicas parasitológicas e sorológicas clássicas e sem necessidade de isolamento do parasito. Muitos estudos mostram sensibilidade acima de 90% e especificidade de até 100% (Dishet al.2003). A técnica de PCR detém também a vantagem de poder ser utilizada em estudos epidemiológicos com cães assintomáticos em áreas endêmicas. (Genaro, 2003).

Existem vários protocolos do PCR, com iniciadores ou primers desenhados para diferentes alvos moleculares do genoma de *Leishmania* com objetivo em determinar certas sequências de genes (Oliveira et al. 2015). As principais vantagens do uso da PCR, constituem na sua maior sensibilidade, possibilitando a identificação de material genético de *Leishmania* mesmo em quantidades mínimas, além de a técnica não depender do isolamento e cultivo do parasito, levando a uma maior rapidez do diagnóstico (Britto & Pereira, 2014).

A técnica de PCR trouxe inovação nas pesquisas tanto de vetores quanto no estudo dos hospedeiros e reservatórios de *Leishmania spp.* O método tem como base a síntese de milhares de cópias de DNA *in vitro* catalisada pela Taq DNA polimerase. Para o prosseguimento da técnica é necessário o conhecimento prévio do DNA alvo do organismo, para o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (primers) que irão hibridizar-se especificamente à sequência alvo. A partir da PCR outra técnica empregada é o sequenciamento de DNA, que permite a análise detalhada de um gene (Britto & Pereira, 2014).

Vários alvos gênicos têm sido empregados em estudos voltados para a identificação da espécie de *Leishmania*, incluindo diversas porções do genoma, desde regiões espaçadoras intergênicas, genes (ou parte desses) nucleares e mitocondriais. Podemos citar alguns dos ensaios diagnósticos para *Leishmania spp.* utilizando a PCR em flebotomíneos, que têm sido desenvolvidos baseados em diferentes alvos moleculares como: minicírculos do kDNA (Perez et al. 1994; El Tai et al. 2000; Miranda et al. 2002; Pita- Pereira et al. 2005; 2008; 2009; 2011; Souza-Rocha et al. 2010, Carvalho et al. 2010; Rassiet al. 2012), genes da subunidade menor do ribossomo (SSU) (El Tai et al. 2000; Rassi et al. 2012; Carvalho et al. 2017) e espaçados internos transcritos (ITS) (El Tai et al. 2000; Carvalho et al. 2017), sequências espaçadoras do gene de mini-exon (Paiva et al. 2006), sequências subteloméricas e sequências nucleares de cópia única, como o gene de citocromo b (cyt b) e gene da DNA polimerase α (Souza- Rocha et al. 2010, Bezerra-Vasconcelos et al. 2011), cisteína- proteinase b (cpb) e hsp70 (Perez et al. 2007), genes que codificam Manose fosfato isomerase (MPI) e 6-fosfogluconatodesidrogenase(6PGD) (Valdivia et al. 2012). Pita-Pereira et al. (2005) descreveram um ensaio molecular em flebotomíneos por PCR direcionado para a detecção da região conservada do kDNA gênero *Leishmania*. Os minicírculos de kDNA, representados em milhares de cópias no genoma mitocondrial, e possuem uma região de sequência conservada (presente em todas as espécies de *Leishmania*). Além disso, as moléculas de minicírculos estão representadas na rede de kDNA em torno de 10.000 cópias por célula de *Leishmania*, sendo o alvo molecular que apresenta maior sensibilidade para o diagnóstico de infecção natural em áreas endêmicas. Um estudo realizado por Bezerra-Vasconcelos et al. (2011) corrobora a sensibilidade ótima do alvo de kDNA, através da comparação com outros genes presentes em diferentes números de cópias, para a detecção e quantificação de *L. (L.) infantum* em amostras de *Lutzomyia. longipalpis*, por PCR em tempo real. Neste estudo foram comparados os alvos kDNA, polimerase α (cópia única) e a subunidade ribossômica 18S, e os

minicírculos do kDNA exibiram uma maior sensibilidade entre os genes testados (Bezerra-Vasconcelos et al. 2011).

A família de proteínas de choque térmico (HSP) apresentam um papel importante em processos diversos, incluindo secreção, regulação, estabilização e degradação de proteínas (Yang & Rothman, 2004). O uso de hsp70 para diferenciar entre espécies de *Leishmania*, foi apresentado por Garcia et al. (2004). Posteriormente, vários estudos avaliaram o potencial deste marcador para identificação precisa de espécies de *Leishmania* (Garcia et al. 2005, 2007; Fraga et al. 2010; Graça et al. 2012, Zampieri et al. 2016). Pita-Pereira et al. (2012) demonstraram o potencial de aplicação da região conservada dos minicírculos de kDNA para diferenciar entre subgêneros de *Leishmania*, porém o alvo kDNA não possibilita a identificação em nível de espécies. Assim, ensaios complementares a PCR-kDNA foram propostos por Graça et al. (2012), através da utilização do fragmento de 234 pb do gene hsp70 de *Leishmania*, permitindo assim a detecção acurada da espécie do parasito circulante em áreas endêmicas para *Leishmania* spp. Tem sido demonstrada a eficiência do alvo hsp70 em amostras de pacientes (Graça et al. 2012; Teles et al. 2015; Zampiere et al. 2016), reservatórios (Cássia- Pires et al. 2014), e mais recentemente na tipagem de espécies de *Leishmania* presentes no tubo digestivo de flebotomíneos (Zampiere et al. 2016; Teles et al. 2016, Araujo- Pereira et al. 2017. Zampiere et al. (2016), desenharam iniciadores internos ao fragmento de 234 pb do gene hsp70, gerando produtos menores (144 e 104 pb), os quais foram empregados para a distinção entre espécies de *Leishmania* pela metodologia de High Resolution Melting (HRM). Analisando a curva de dissociação destes amplicons, foi possível diferenciar entre as espécies do Novo Mundo *L. (L.) infantum*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, pelo perfil de dissociação observado para o fragmento de 144 pb do gene hsp70. Os resultados apresentados para o fragmento de 104 pb, demonstraram a distinção entre *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (L.) amazonensis/L. (L.) mexicana*, sendo que para estas duas últimas espécies torna-se necessário o sequenciamento do produto amplificado. Para Solano-Gallego et al.(2001) a aplicação da PCR em conjunto com a sorologia pode ajudar a determinar a extensão da infecção subclínica da doença em áreas endêmicas, como observado na Europa. A PCR detecta o DNA do parasita antes da soroconversão enquanto os testes sorológicos têm sensibilidade aumentada com a progressão da doença com o aumento no título de anticorpos (Quinnell et al. 2001).

Dessa forma, no presente estudo utilizamos do teste rápido sorológico imunocromático- TR - DPP®, para triagem dos casos, combinado com o teste molecular PCR utilizando diferentes alvos intergênicos: ITS1 e kDNA para confirmação da infecção e o alvo hsp70 para tentar acurar a espécie causadora da infecção.

4–Objetivos

4.1–Objetivo Geral:

Realizar o diagnóstico diferencial e comparativo, através de métodos sorológico e molecular, da infecção por *Leishmania* spp. em cães submetidos à coleta sanguínea em clínica veterinária privada na região Oceânica do Município de Niterói/RJ.

4.2-Objetivos Específicos:

- I. Utilizar o teste rápido (DPP) como triagem da infecção canina;
- II. Realizar o teste molecular (PCR) para confirmação da infecção canina – Alvo intergênico ITS1 em todas as amostras;
- III. Efetuar o teste molecular (PCR) para confirmação da infecção canina – Alvo intergênico kDNA apenas nas amostras consideradas positivas em qualquer um dos testes acima;
- IV. Utilizar o teste molecular (PCR) - alvo intergênico HSp70 para o diagnóstico específico da *Leishmania* spp. nas amostras consideradas positivas em qualquer um dos testes acima.

5-Considerações Éticas

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEUA) da Fiocruz e aprovado sob o nº017 /2017, para avaliação dos procedimentos envolvendo a coleta de material biológico em animais. (Anexo I).

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com Princípios Éticos na Experimentação Animal pela Médica Veterinária Caroline Magalhães Cunha, CRMV 11.099 do Health Veterinary Center em Itaipu, Niterói, RJ. Os proprietários dos cães que participaram da pesquisa receberam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II), com todas as informações necessárias sobre o presente estudo.

6- Materiais e Métodos

6.1 - Área de Estudo

A clínica veterinária, onde as amostras utilizadas no presente estudo foram coletadas (Clínica Health Veterinary Center) está situada em Itaipu, Região Oceânica do Município de Niterói / RJ, funciona 24h atendendo uma média de 8 a 10 cães diariamente para diversos serviços.



Figura 2: Clínica Health Veterinary Center onde foram realizadas as coletas das amostras do presente estudo.

O município de Niterói está localizado na Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, compondo ao lado da cidade do Rio de Janeiro e mais 16 municípios, a segunda maior concentração urbana do país. Com uma taxa de urbanização de quase 100% a cidade de Niterói ocupa uma área de 131,5 quilômetros quadrados, apresentando uma população estimada para o ano de 2007 de 475.000 habitantes (IBGE, 2007). O município de Niterói faz divisa com os vizinhos São Gonçalo (ao Norte), Maricá (ao Leste), sendo banhado ao Sul pelo Oceano Atlântico e a Oeste pela Baía de Guanabara. O crescimento populacional sucedido em Niterói nas últimas décadas não se distribui uniformemente pelo território, e as Regiões de Pendotiba e Oceânica apresentam taxas mais expressivas de crescimento (PMN, 2000).

Dentre as áreas de Planejamento de Niterói, a Região Oceânica é a maior do município, possuindo uma área de 46,6 km², correspondente a 34,6% da área municipal. Segundo os censos demográficos de 1991, 1996 e 2000 (IBGE) as taxas de crescimento populacional registradas nos bairros desta região, figuraram entre as mais altas do município e

da própria Região Metropolitana do Rio de Janeiro (Saladia, 2001). A Região Oceânica está situada no entorno das praias oceânicas, sendo composta pelos bairros do Cafubá, Camboinhas, Engenho do Mato, Itacoatiara, Itaipu, Jacaré e Piratininga. Quanto à cobertura vegetal, a Região Oceânica caracteriza-se pela presença de vegetação arbustiva e pela Mata Atlântica, cuja extensão territorial sofreu importante redução, consequência de desmatamentos ao longo dos tempos. Drenada pelas bacias dos rios Jacaré e João Mendes, a região se caracteriza pela alternância de baixadas, restingas, morros, costões rochosos e algumas escarpas. (Silveira, 2005).

A Região Oceânica tornou-se uma importante área de expansão urbana do município de Niterói, principalmente a partir da década 70 com a conclusão da ponte Rio-Niterói. Investimentos na melhoria do sistema de transporte rodoviário possibilitaram um incremento no processo de ocupação, anteriormente caracterizado por residências temporárias de finais de semana. Este processo de ocupação provocou uma elevação no custo das propriedades locais e terrenos ainda não edificadas. Consequentemente houve o remanejamento da população de menor renda particularmente para encostas e reservas florestais. A região conta com uma crescente rede local de serviços como bancos, clínicas, clínicas veterinárias supermercados, escolas, shopping centers, lojas de materiais de construção, que oferecem produtos e serviços que antes estavam somente disponíveis nas áreas centrais do município (PMN,2000).

A área oceânica de Itaipu localiza-se aproximadamente pelas coordenadas geográficas: Latitudes 22° 55'e 22° 59'S e Longitudes 43° 02'e 43° 06'W. A região possui uma superfície de cerca de 45 km², com um formato de um “anfiteatro” rochoso nas bordas laterais, aberto para o oceano e limitado pelo Morro da Viração (Oeste), e pela Serra da Tiririca (Leste), Unidade de Conservação de Proteção Integral criado em 1991 que tem como um de seus objetivos preservar a fauna silvestre do bioma a que pertence composto por uma área de transição entre Mata Atlântica e zona urbana, abrigando além da fauna silvestre, uma população humana domiciliada associada a animais domésticos. Essa aproximação entre animais domésticos e silvestres, além do homem se acentuou, tornando-se preocupante, uma vez que foram relatados diversos casos de LTA nas encostas da Serra da Tiririca principalmente em algumas áreas de Itaipu.

Segundo censo 2010 a população de Itaipu é de 6.320 habitantes distribuídos entre homens e mulheres. A escolha da área foi feita devido aos estudos que relatam presença de vetores do parasito transmissor tanto de leishmaniose visceral quanto de leishmaniose

tegumentar (Fuzari et al. 2013, 2016) além de inquérito epidemiológico canino e levantamento entomológico para avaliar a extensão das leishmanioses (Oliveira et al. 2015) e de dados do Centro de Controle de Zoonoses de Niterói que mostraram presença de cães sorologicamente positivos para LV na região (Madeira et al. 2000).

Até início de 2014, foram notificados 38 caninos positivos para Leishmaniose Visceral Canina. A investigação e notificação de casos de LVC tem aumentado significativamente no município de Niterói (Nunes et al. 2015).

O controle da população dos animais domésticos e a educação ambiental quanto à guarda responsável e prevenção de zoonoses são ações de necessidade urgente para minimizar o impacto à fauna selvagem e à saúde humana.

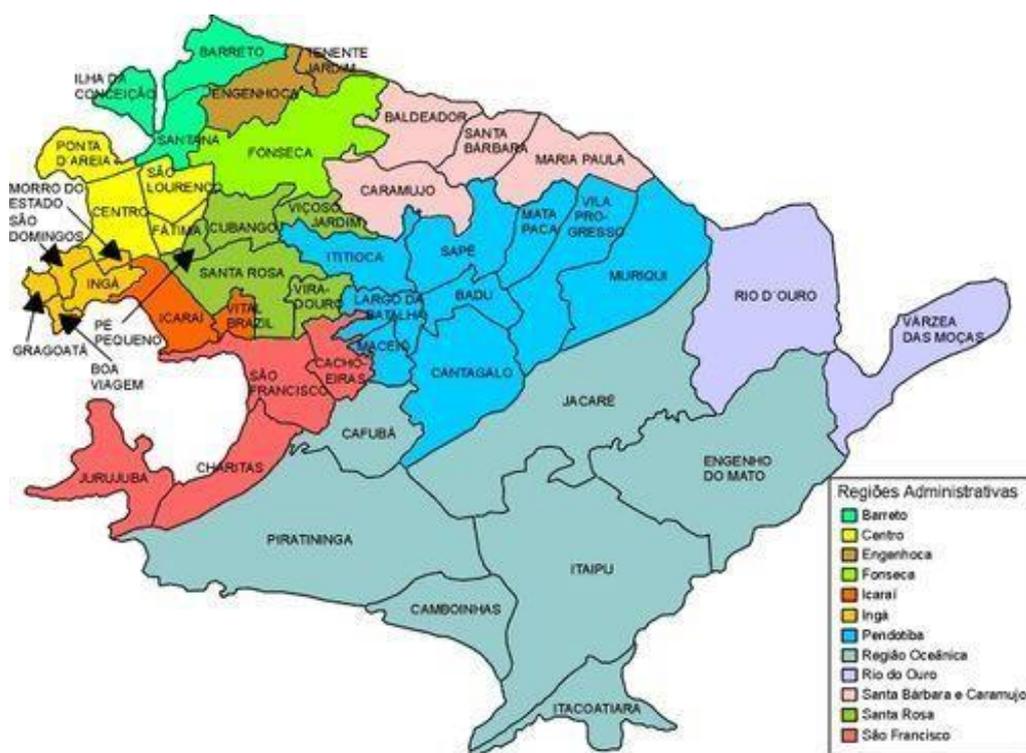


Figura 3: Regiões Administrativas do Município de Niterói/ Rio de Janeiro.

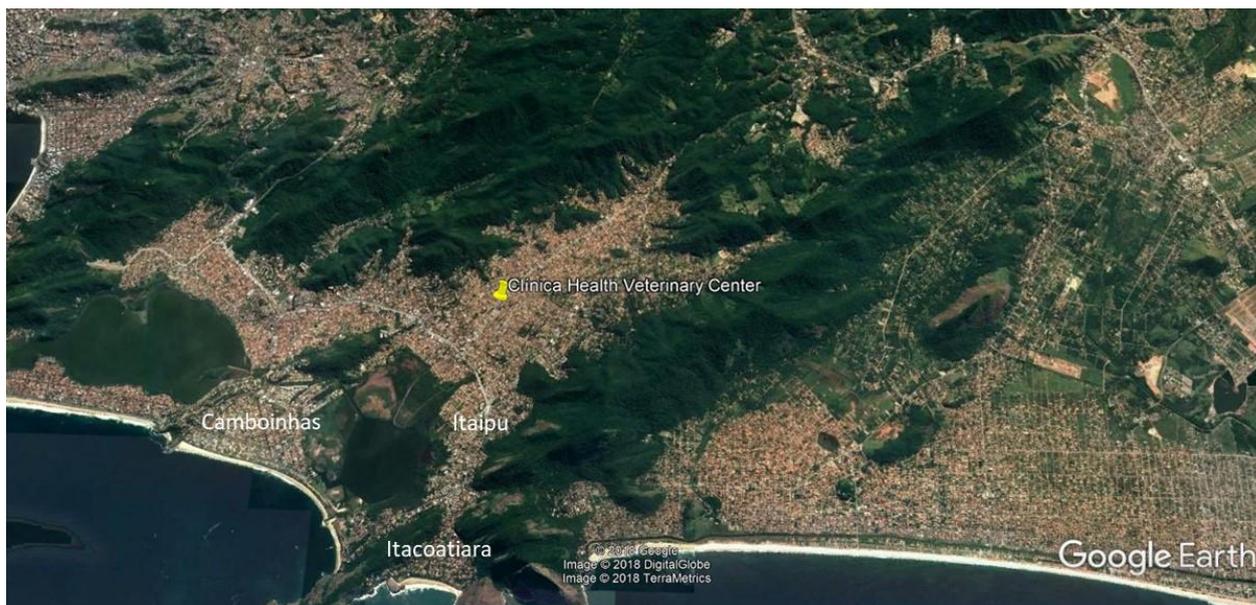


Figura 4 – Localização da Clínica Veterinária Health Veterinary Center (Google Earth)

6.2- Amostra de Cães e coleta sanguínea

No estudo foram utilizadas amostras de sangue canino, coletadas de todos animais atendidos por quaisquer motivos (banho e tosa, consulta clínica, dentre outros) na Clínica Veterinária Health Veterinary Center, residentes em Itaipu e os quais os proprietários aceitaram a participação de seus animais no estudo, no período de Março 2017 a Agosto 2017. A coleta foi realizada pela Médica Veterinária Caroline Magalhães Cunha, CRMV 11.099 da Clínica Health Veterinary Center em Itaipu, Niterói, RJ. O número de animais avaliados foi definido em função da entrada na clínica, obedecendo os critérios acima descritos.

Os animais foram contidos e submetidos à coleta de sangue periférico. Após garroteamento do membro e assepsia local, foi realizada a punção e coletado o sangue periférico da veia jugular (sem garrote) ou radial (garrote de látex) utilizando agulha 23G e seringas de 5 ml estéreis e descartáveis sendo coletados cerca de 2ml de sangue. Foi utilizada, imediatamente após coleta, uma gota de sangue para realização do diagnóstico sorológico através de teste imunocromatográfico (TR DPP®), fornecido por Biomanguinhos e o restante acondicionado em tubos EDTA estéreis, com anticoagulante e mantidas sob refrigeração em caixas isotérmicas para transporte e posterior diagnóstico molecular no laboratório.



Figura 5: Coleta sanguínea dos cães residentes em Itaipu, Região Oceânica de Niterói, analisados no estudo, na Clínica Veterinária Health Veterinary Center. Período março a agosto de 2017.

6.3 – Testes Diagnósticos

6.3.1 - Teste Rápido Imunocromatográfico DPP® (Dual PathPlatform)

O ensaio qualitativo para detecção de anticorpos para leishmaniose visceral canina, designado Teste Rápido Imunocromatográfico DPP® (Dual Path Platform) foi utilizado para fins de triagem, utilizando as amostras previamente obtidas.

O Teste Rápido Imunocromatográfico DPP® se fundamenta na reação de anticorpos presentes no sangue do animal infectado com uma combinação única de antígenos recombinantes específicos de *Leishmania (Leishmania) infantum* (rK26 e rK39) (Silva et al. 2014).

A técnica foi realizada utilizando-se sangue total. Uma gota do sangue foi colocada no primeiro poço acrescentando-se 2 gotas da solução tampão e após 5 minutos foram acrescentadas mais 4 gotas da solução tampão no segundo poço. Após 10 minutos foi observado o resultado. Totalizando 15 minutos de teste. O teste foi considerado positivo quando duas bandas, uma referente ao controle do teste (C) e outra referente à amostra testada (T), apareceram dentro dos quinze minutos pós teste, e negativo, quando apenas a banda

referente ao controle aparecer. Houve repetição nos casos em que nenhuma banda foi visualizada.

6.3.2 – Testes Moleculares

Os ensaios moleculares foram utilizados para detecção de *Leishmania* spp. nas amostras de sangue coletadas dos cães participantes do estudo. O teste molecular PCR utilizando-se como alvo intergênico o ITS1, foi realizado em todas as amostras, incluindo as consideradas negativas segundo o teste DPP, já o teste molecular PCR utilizando-se o kDNA como alvo intergênico, foi realizado apenas nas amostras consideradas positivas por algum dos testes acima.

6.3.2.1 - Extração de DNA das amostras de sangue coletadas

O sangue canino foi armazenado individualmente em microtubos de polipropileno de 1,5 ml e estocado à temperatura de -20°C para a extração de DNA, e como controle negativo foi utilizado amostra de água livre de DNA.

Durante a extração do DNA foi utilizado o kit comercial de extração GentraPuregene® CelandTissue (QIAGEN), as concentrações dos reagentes não foram especificadas pelo fabricante.

A extração das amostras seguiu utilizando a mesma sequência da metodologia para todas amostras. Os volumes empregados na extração das amostras estão especificados a seguir dentro dos parênteses. Os microtubos de polipropileno contendo as amostras foram retiradas do freezer -20°C e, após o descongelamento, foi adicionado 300µl de solução de lise celular, contendo 1,5µl de proteinase K nos microtubos. Em seguida, os microtubos foram incubados em banho-maria a 55°C *overnight*. Após esse período, foi adicionado 1,5µl de RNase, os microtubos foram homogeneizados e incubados em banho-maria a 37°C por 1 hora e posteriormente incubado por 1 min no gelo e adicionado 100µl de solução de precipitação de proteína. Em seguida, os microtubos foram centrifugados por 3 minutos a 14.000rpm e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril e identificado contendo 300µl de isopropanol (100%). Os microtubos foram homogeneizados e, novamente, centrifugados por 5 minutos a 14.000rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300µl de etanol (70%) em cada amostra e centrifugados por 5 minutos a

14.000rpm. Ao término da centrifugação, descartou-se novamente o sobrenadante e os microtubos foram invertidos em papel absorvente para a evaporação do etanol.

O DNA extraído foi ressuspensão em 20µl de solução de reidratação e os microtubos foram incubados a 65°C por 1 hora para a reidratação do DNA. Em seguida, o DNA foi incubado em temperatura ambiente overnight, e posteriormente, foram estocados em freezer - 20°C até a utilização. As amostras de DNA total das amostras coletadas foram padronizadas em 100 ng/µl.

6.3.2.2 - PCR – Alvo intergênico ITS1 - para verificar a infecção natural por *Leishmania spp.* nas amostras coletadas

O DNA extraído foi submetido à técnica de PCR para amplificação de uma região alvo do DNA de *Leishmania spp.*, para essas análises utilizamos dois indicadores: o ITS1 (internaltranscribedspacer 1) (LITSR 5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' e L5.8S 5' TGATACCACTTATCGCACTT 3' amplificam um fragmento de aproximadamente 350pb) (Schonianet al; 2003), que é uma região intergênica entre os genes SSU e 5.8S como demonstra a figura 4, podendo distinguir as seguintes espécies de *Leishmania*: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamanensis*(Cupolillo et al. 2009).

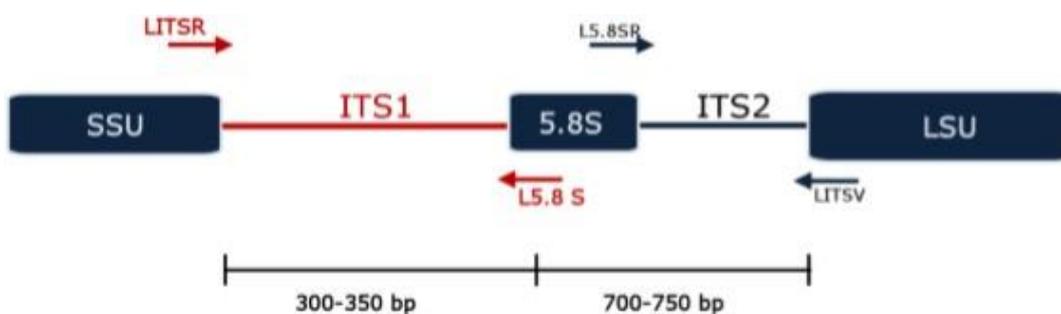


Figura 6: Figura ilustrativa da Região intergênica do ITS1.

Na PCR foi realizada a amplificação de um fragmento de aproximadamente 350pb por meio da seguinte reação: solução tampão 1x (200 mM Tris-HClpH8,4, 500 mM KCl), 1,5mM

de MgCl₂, 0,2mM de mistura de dNTPs, 0,5 pmol do iniciador LITSR, 0,5 pmol do iniciador L5.8S, 1 U de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen) e 5 µl de DNA molde, em um volume final de 25µL. A amplificação foi realizada alternando-se 33 ciclos de desnaturação a 95oC por 30seg, anelamento a 53oC por 1min e extensão a 72oC por 1min em equipamento termociclador automático de DNA (MaxyGeneGradient - AXYGENE®). Os perfis de banda amplificadas foram analisados em gel de agarose 2% corado com GelRed™, concentração utilizada: GelRed 10.000X em 500µl de água livre de contaminações (1:500), foi aplicado 1µl de GelRed™ diluído, 01µl de tampão de carregamento e 5µl de produto amplificado na PCR, e comparados com produto de PCR de cepas referência de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903).

Para a obtenção do DNA das cepas de referências foram adotados os seguintes procedimentos: as alíquotas de culturas de cepas referência de *Leishmania* foram adicionadas a tubos contendo meio de cultura NNN (Novy e Mc Neal, 1903; Nicolle, 1908) enriquecidos com Schneider, mantidos à 25° C ± 1°C por aproximadamente 30 dias. Quando o número de células promastigotas alcançou 1x10⁸, foi realizada a lavagem da massa de parasitos e posterior extração do DNA. A massa de promastigotas foi obtida centrifugando um volume de 30mL de cultura a 3000 rpm por 10 minutos. Em seguida, despejou-se o sobrenadante e recolheu-se o pellet, o qual foi lavado três vezes com PBS 1x em pH7.2 estéril. O pellet contendo as promastigotas foi submetido à extração utilizando também o kit comercial de extração GenraPuregene® (QIAGEN), como procedeu para as amostras coletadas. A concentração de DNA de *Leishmania* empregada como controle positivo nos experimentos de PCR foi de 100ng/µl.

6.3.2.3 – PCR –Alvo intergênico kDNA-para verificar a infecção natural por *Leishmania* spp.nas amostras coletadas.

Foram utilizadas amostras positivas de acordo com o teste DPP e a amostra positiva de acordo com o PCR (alvo ITS1). Para a PCR foi utilizada um par de iniciador que amplifica um produto de 120 pb referente ao DNA de *Leishmania*. O par amplifica a região conservada dos minicírculos do kDNA; primer A [5' GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC 3'] e primer B [5'GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA 3'] (Passos et al., 1996).A reação ocorreu em um volume final de 100 µL, consistindo de solução tampão da PCR 1X (10mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM de KCl, AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA), 4,5 mM gCl₂, 200 µM de cada dNTP (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 0,2 µM de cada primer, 1,25

U Taq Gold DNA polimerase (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA), 10 µL de DNA e H₂O (ultrapura e estéril, grau Biologia Molecular) para completar o volume. A ciclagem térmica consistiu de 36 ciclos e foi realizada no aparelho modelo Gene Amp® PCR System 9700, com a seguinte programação, por ciclo: desnaturação (30 s, 94 °C), anelamento (30 s, 55 °C) e extensão (30 s, 72 °C). Este programa foi precedido de uma etapa (12 min, 94 °C) para ativação da enzima (Hot Start) e após os 36 ciclos foi incluído um passo de extensão final (10 min, 72°C).

6.3.2.4 - Reação em Cadeia da Polimerase alvo intergênico Hsp70 – Identificação de espécies de *Leishmania* provenientes das amostras positivas.

Após a confirmação da detecção de *Leishmania* em algumas amostras de sangue, o DNA recuperado de cada amostra foi submetido a um ensaio de PCR-nested direcionado para o gene hsp 70. Na primeira etapa da PCR foi amplificado o fragmento de 234 pb do gene hsp 70 - primer forward 5' GGACGA GAT CGA GCG CAT GGT 3' e primer reverse 5' TCC TTC GAC GCCTCC TGG TTG 3' (Graça et al., 2012). A segunda etapa utiliza o produto de PCR da primeira reação e os primers reverse 5' TCC TTC GAC GCC TCCTGG TTG 3' (Graça et al., 2012) e forward 5' GGA GAA CTA CGC GTA CTCGAT GAA G 3' (Zampieri et al., 2016), que amplificam uma região de 144 pb interna ao fragmento de 234 pb do gene hsp70.

Ambas as reações ocorreram em um volume final de 50 µL, consistindo de Gotaq® Green Master Mix (Promega®) 1X, 0,2 µM de cada primer, 5µL de DNA e H₂O (ultrapura e estéril, grau Biologia Molecular) para completar o volume. A ciclagem térmica consistiu de 36 ciclos e foi realizada no aparelho modelo Gene Amp® PCR System 9700, com a seguinte programação, por ciclo: desnaturação (30 s, 95 °C), anelamento (30 s, 55 °C) e extensão (30 s, 72°C). Este programa foi precedido de uma etapa (5 min, 95 °C) para ativação da enzima e após os 36 ciclos foi incluído um passo de extensão final (5 min, 72°C).

6.3.2.5 - Eletroforese em gel de agarose

Os ensaios de eletroforese foram realizados, tanto no PCR(ITS1) quanto no PCR(kDNA) e PCR (Hsp70) em cuba horizontal, em géis de agarose (Seakem e NuSieve, FMC Bioproducts, Rockland, USA) a 2,0%, com dimensões de 12,5 x 20cm, preparados em TBE (0,89 M Tris-HCl; 0,89 M ácido bórico; 0,024M EDTA, pH 8,3 - TBE 10X). Após a imersão do gel solidificado em tampão TBE, alíquotas contendo 10 µL do produto da PCR foram misturadas a 1 µL do tampão de aplicação de amostra (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol) e aplicadas no gel. A eletroforese foi conduzida por 2 h à 70 V. O peso molecular dos amplicons foi determinado pela inclusão do marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder – Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). O gel foi corado com Nancy- 520 DNA Gel Stain (Sigma®) e após a corrida, os resultados foram registrados através de um sistema fotográfico de documentação em gel – UVP Bioimaging Systems.

7 - Resultados

O período de coleta do estudo compreendeu o período de março a agosto de 2017, e foram obtidas um total de 174 amostras de sangue de cães residentes de Itaipu, Região Oceânica de Niterói/RJ, levados à Clínica Veterinária Health Veterinary Center. A participação dos animais no estudo contou com o aceite dos seus proprietários, e compreendeu cães de diferentes idades, raças e sexos. Foi realizada triagem, pesquisa da infecção canina através de testes de DPP e PCR(ITS1) em todas as amostras além de PCR(kDNA) e PCR(HPS70) apenas nas amostras positivas para algum dos testes anteriores. Do total de amostras coletadas, foram analisadas animas com idades entre 1 – 17 anos, sendo a maior porcentagem de animais com a idade de 5 anos (15%). (Figura7).

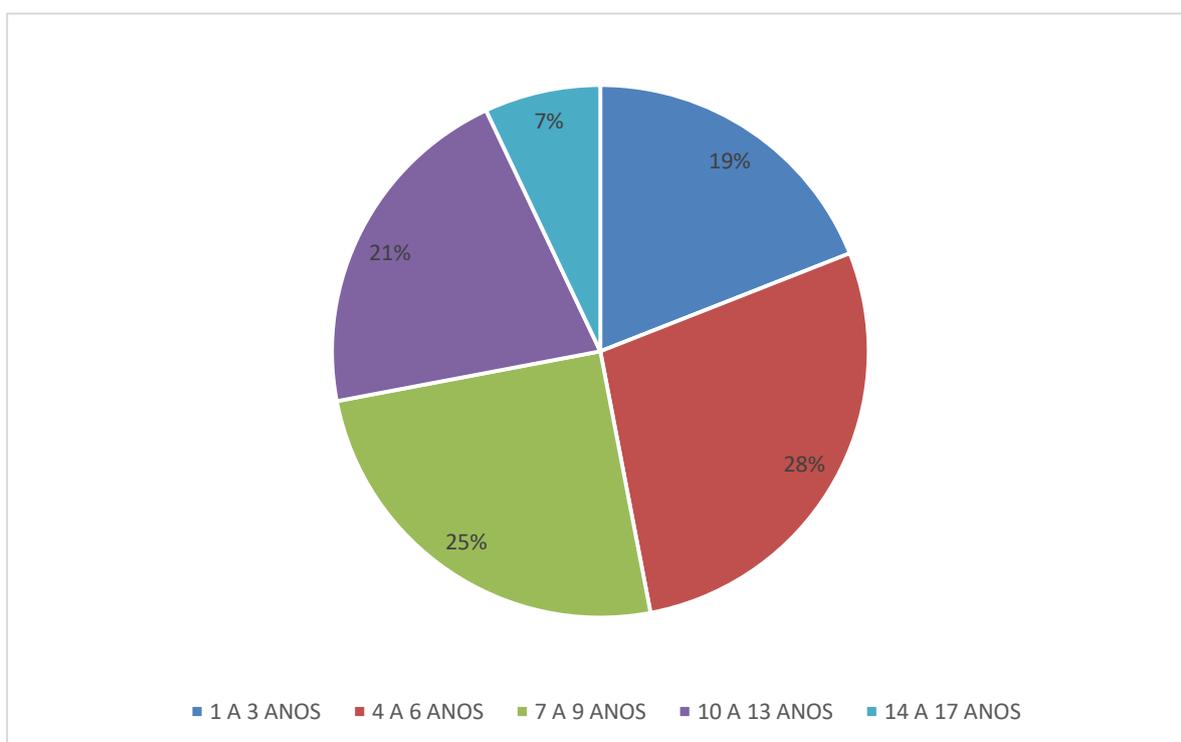


Figura 7 – Porcentagem de acordo com a idade dos cães analisados no estudo.

Dentre as raças analisadas, os cães sem raça definida (SDR) tiveram a maior porcentagem (49%) seguido da raça labrador (7%). (Figura 8).

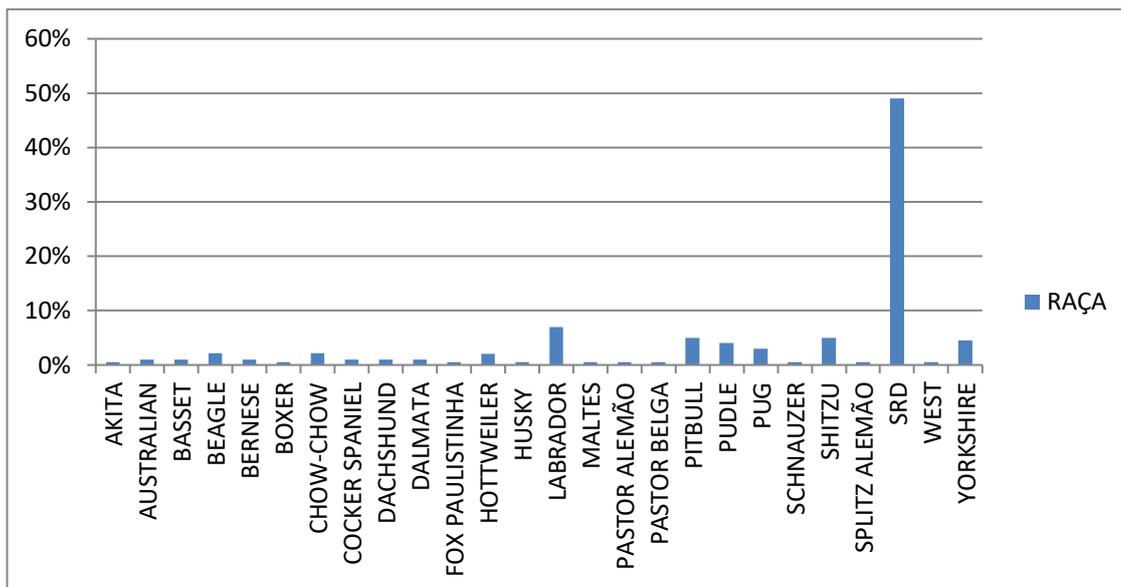


Figura 8 – Porcentagem de acordo com a raça dos cães analisados no estudo.

Referente ao sexo dos animais participantes do estudo, dentre os 174 animais analisados 51,7% foram machos e 48,2% fêmeas. (Figura 9).

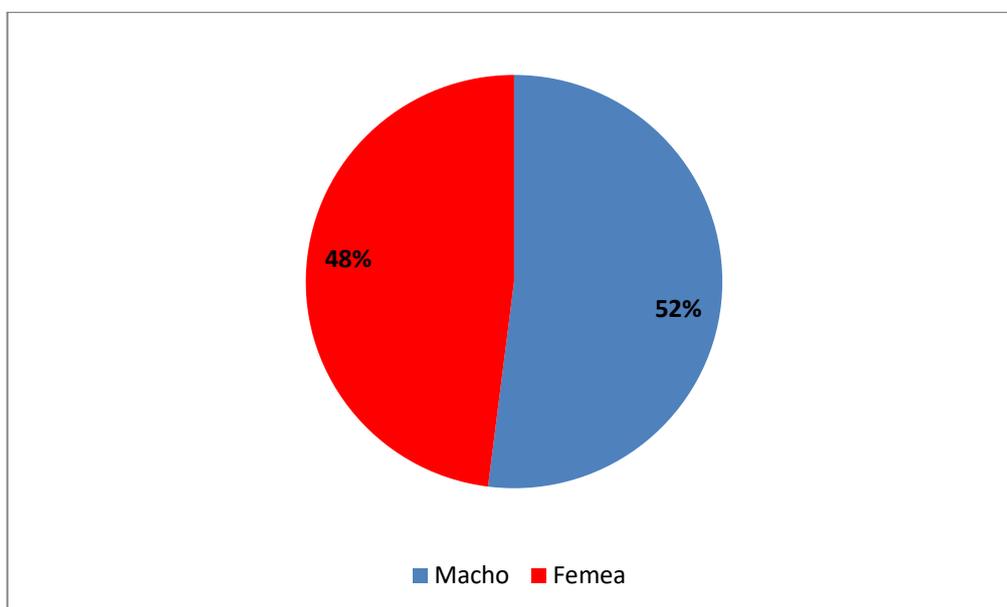


Figura 9 – Porcentagem de acordo com sexo dos cães analisados no estudo.

Das 174 amostras analisadas, 5 amostras foram positivas: 4 foram positivas para o teste de DPP (2,29%) (Figura 10) e uma positiva pelo PCR (ITS1) (figura 11). Nenhuma amostra considerada positiva pelo teste DPP foi confirmada pelo teste PCR (ITS1).

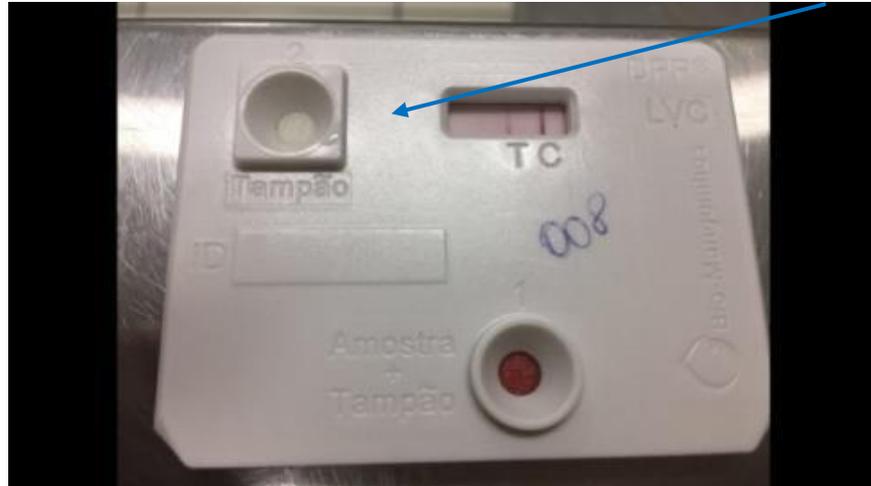


Figura 10: Teste DPP demonstrativo da pesquisa de infecção natural por *Leishmania* spp. em sangue coletado de cães residentes em Itaipu, Região Oceânica do Município de Niterói/RJ, atendidos na Clínica Veterinária Health Veterinary, 2017. Teste positivo pela observação de duas bandas, uma referente ao controle do teste (C) e outra referente à amostra testada (T), indicado pela seta azul.

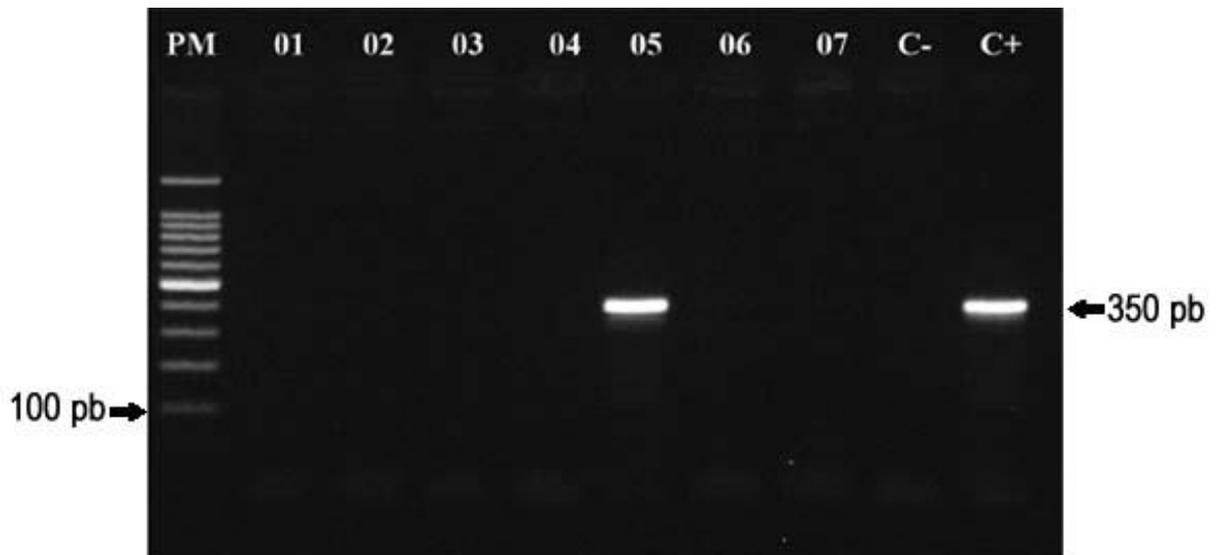


Figura 11: Gel demonstrativo da pesquisa de infecção natural por *Leishmania* spp. em sangue coletado de cães residentes em Itaipu, Região Oceânica do Município de Niterói/RJ, atendidos na Clínica Veterinária Health Veterinary, 2017. Utilização do ITS1 como alvo intergênico. Gel de agarose 2% corado com gel Red. PM: marcador de pares de base (100pb); C-: Controle negativo (água pura livre de DNA); C+: controle positivo DNA de cultura de

Leishmania spp. (MHOM/BR/75/M2903); Gel demonstrando 7 amostras sendo a amostra de número 5 considerada positiva.

Pelo teste molecular PCR utilizando alvo intergênico kDNA, foram analisadas as 5 amostras positivas – 4 positivas pelo DPP e 1 positiva pelo PCR(ITS1) – Em todas foi confirmada a positividade (figura 12).

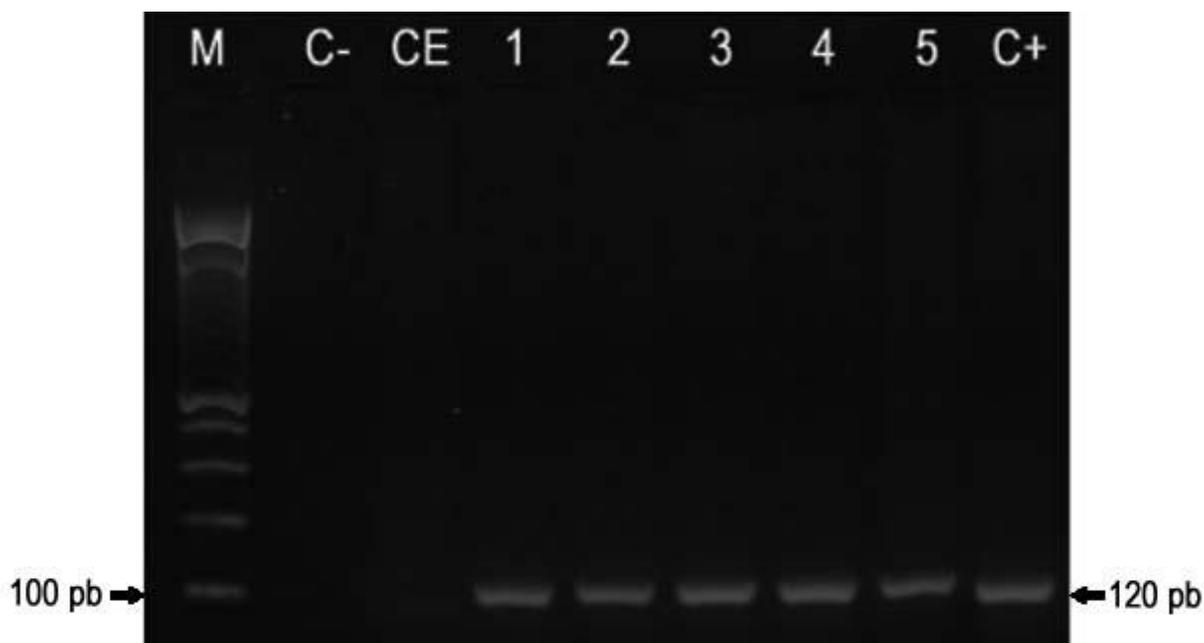


Figura 12: Gel demonstrativo da pesquisa de infecção natural por *Leishmania* spp. em sangue coletado de cães residentes em Itaipu, Região Oceânica do Município de Niterói/RJ, atendidos na Clínica Veterinária Health Veterinary, 2017 cuja positividade foi detectada em um dos testes anteriores. Utilização do kDNA como alvo intergênico. Gel de agarose 2% corado com gel Red. PM: marcador de pares de base (120pb); C-: Controle negativo (água pura livre de DNA); C+: controle positivo DNA de cultura de *Leishmania* spp. (MHOM/BR/75/M2903) CE: Controle negativo da extração. Gel demonstrando positivities nas 5 amostras testadas.

TESTE	AMOSTRAS POSITIVAS (5)
DPP	4
ITS1	1
kDNA	5
HSP 70	-

Figura 13: Total de positividade de acordo com o teste utilizado – 4 amostras consideradas positivas pelo teste DPP e apenas uma pelo PCR(ITS1), todas as positividade foram confirmadas pelo PCR(kDNA). PCR(HSP70) não foi sensível para detectar nenhuma banda nas amostras analisadas.

Nos cães analisados por DPP em relação às raças, foram detectadas positividade em 2 dos 13 cães da raça labrador e em 2 dos 81 dos cães SRD. (Figura 14).

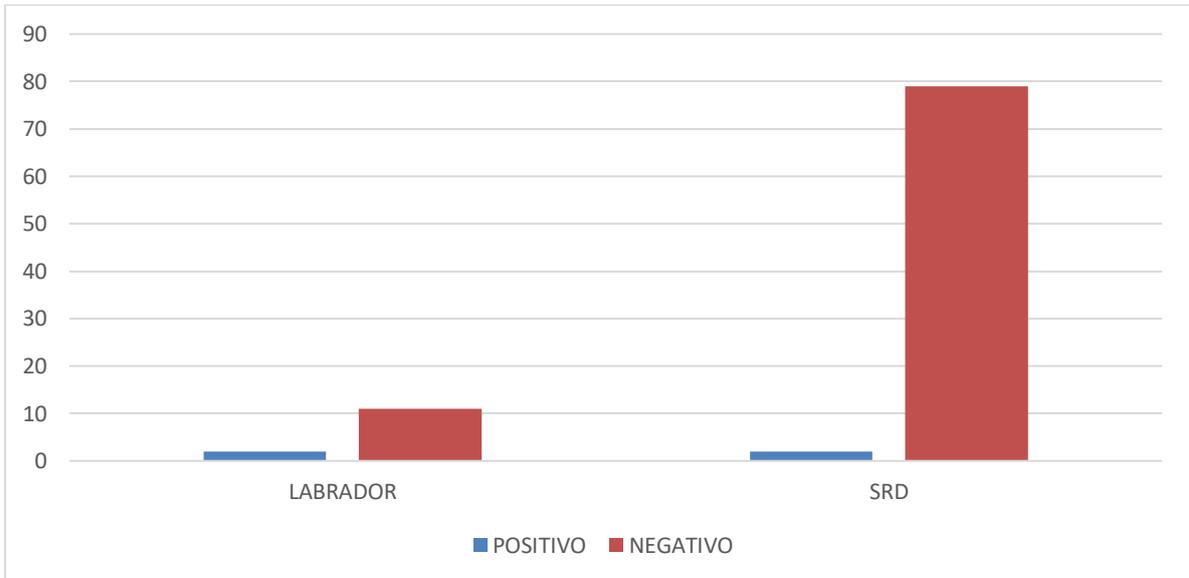


Figura 14 – Gráfico das raças que obtiveram positividade de acordo com o teste DPP utilizado no estudo.

Nos cães avaliados por PCR(ITS1) em relação às raças foram detectadas positividade em 1 dos 81 cães SRD. (Figura 15).

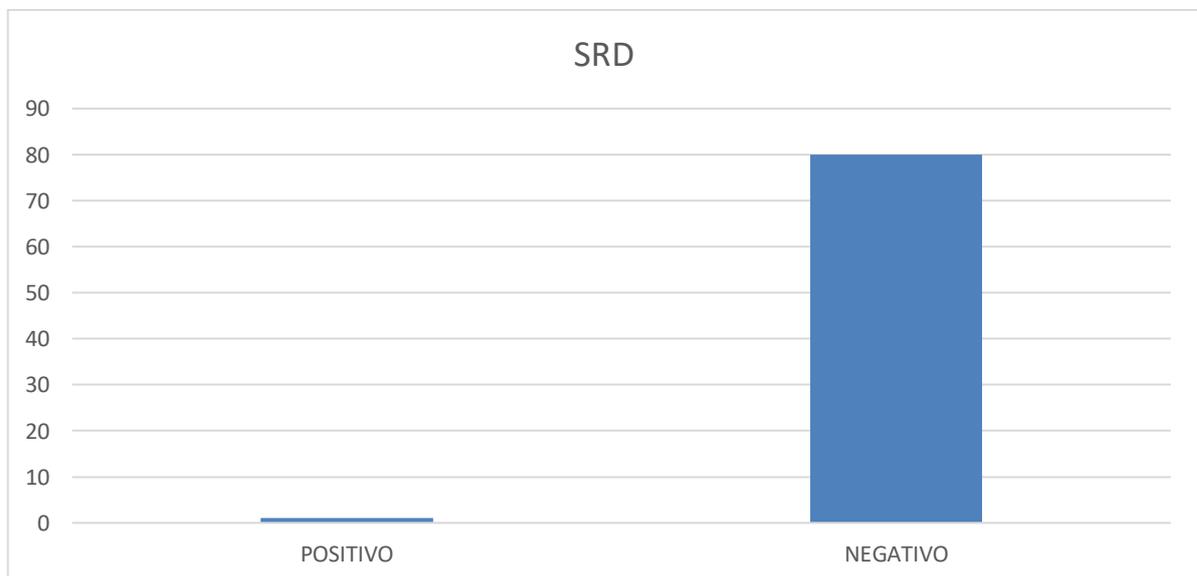


Figura 15 – Gráfico das raças que obtiveram positividade de acordo com o teste PCR(ITS1) utilizado no estudo.

Em relação aos casos analisados por DPP referente às idades foram detectadas positividade em um cão 4 anos de idade, dois cães de 5 anos e um com 15 anos de idade. (Figura 16).

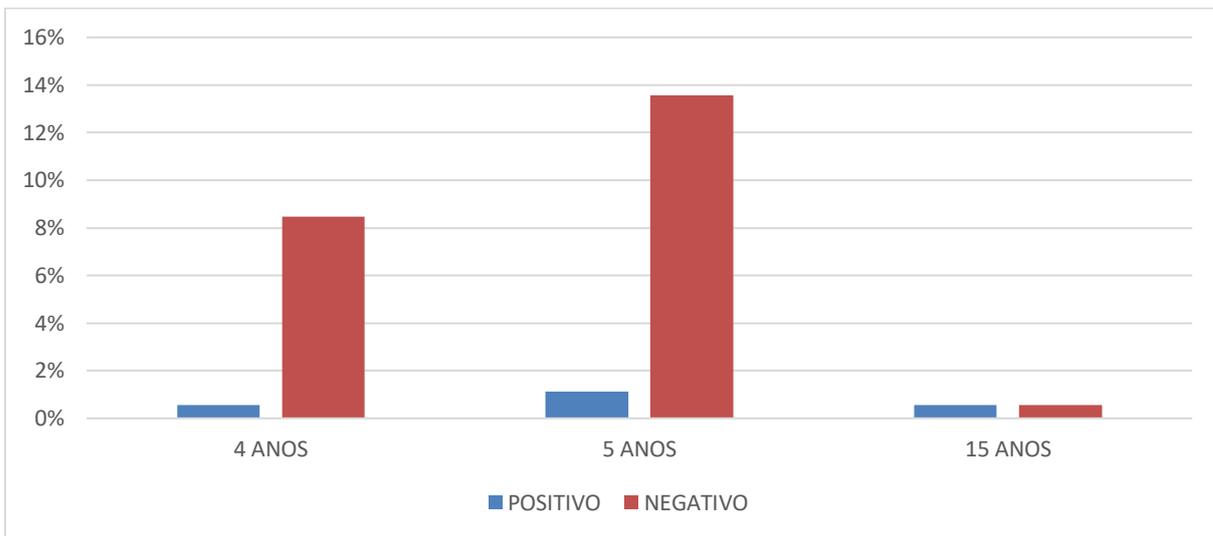


Figura 16 – Gráfico das idades que obtiveram positividade de acordo com o teste PCR(ITS1) utilizado no estudo.

Nos casos analisados por PCR(ITS1) em relação às idades foi detectada positividade em 1 cão de 8 anos de idade (figura 17).

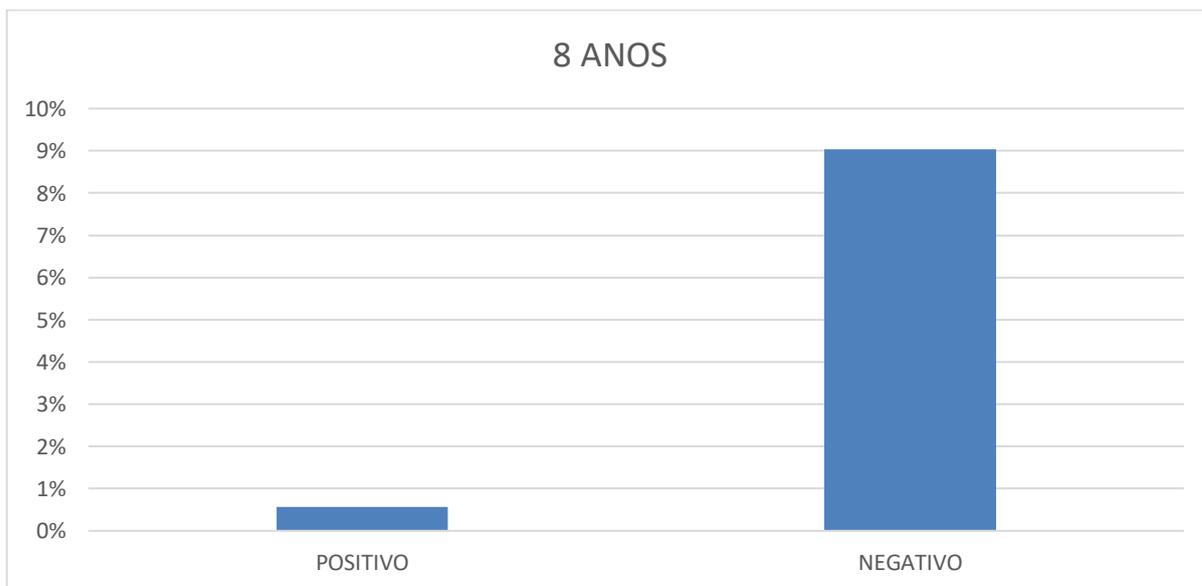


Figura 17 – Gráfico das idades que obtiveram positividade de acordo com o teste PCR(ITS1) utilizado no estudo.

Nos casos analisados por PCR(kDNA) foram confirmadas todas as positivities descritas e demonstradas nos gráficos anteriores, tendo sido confirmadas as 4 positivities demonstradas pelo teste DPP além da única positividade demonstrada pelo teste PCR(ITS1).

A maioria dos cães analisados no estudo apresentaram aparente estado sadio. Dos 174 cães analisados, apenas 4 cães apresentaram sinais clínicos, como emagrecimento, secreção ocular e lesão de patas.

Desses 4, um foi considerado positivo pelo DPP e também pelo PCR(kDNA). Trata-se de um cão da raça labrador de 15 anos de idade. Os outros 3 eram cães SRD, os quais não apresentaram positividade em nenhum dos testes utilizados no estudo.

Dos 5 animais considerados positivos para algum dos testes utilizados no estudo, apenas 1 apresentou sintomas clínicos aparentes.

O teste molecular PCR utilizando alvo gênico HSP70 para investigar a espécie de *Leishmania* spp. que causa a infecção não teve sensibilidade suficiente para detectar bandas em nenhuma das amostras analisadas.

8 –Discussão

Uma vez que a LT e a LV podem ser confundidas entre si e também com outras doenças (Domingos, 2012; Leandro Junior, 2014) e o fato do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) em nosso país ser baseado no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, no controle vetorial nas áreas de transmissão e na eliminação de reservatórios caninos soropositivos para LV, que são os principais reservatórios do parasito em área urbana sendo a orientação recomendada como uma das formas de controle da Leishmaniose Visceral pelo Ministério da Saúde, a eutanásia, nos remete a uma profunda reflexão sobre a necessidade de um diagnóstico confiável dos animais, no sentido de não resultar na eliminação desnecessária de animais com diagnóstico falso-positivo, e da mesma forma, a manutenção daqueles com diagnóstico falso-negativo, já que podem servir como uma importante fonte de infecção da doença (Brasil, 2017, Zanette, 2006, Lemos et al. 2008).

Cabe destacar que em 2016 de acordo com Nota técnica conjunta do Ministério da Agricultura com o Ministério da Saúde, foi liberado o tratamento com o medicamento MILTEFORN para LV canina, porém não configura uma medida de saúde pública para controle da doença já que o tratamento no animal pode até resultar no desaparecimento dos sinais clínicos, porém, os animais continuam como fonte de infecção para o vetor, e, portanto, um risco para saúde da população humana e canina.

Deste modo, o presente estudo teve como objetivo diagnosticar *Leishmania* spp. nas amostras de sangue coletadas de cães, residentes da Região Oceânica de Itaipu, Município de Niterói/RJ, região onde já foi constatada a circulação tanto da LT e da LV e de algumas espécies de flebotomíneos consideradas vetoras de *Leishmania* spp. (Fuzari et al. 2013, 2016) utilizando como triagem o teste imunocromatográfico rápido, DPP - desenvolvido e produzido por Biomanguinhos (FIOCRUZ, Brasil) o qual emprega antígenos recombinantes e o confrontando com os testes moleculares(PCR) utilizando diferentes alvos gênicos.

O DPP apresentou bom desempenho tanto para o diagnóstico sorológico dos animais sintomáticos como dos assintomáticos. Dos 4 animais considerados positivos para esse teste, apenas 1 apresentou sintomas clínicos aparentes o que difere de resultados de estudos anteriores em que Grimaldi et al. (2012), trabalhando com cães sintomáticos (n=60) e assintomáticos (n=60) infectados com *L. (L.) infantum chagasi* mostraram alta especificidade (96%), mas baixa sensibilidade (47%) na identificação de cães infectados sem sinais clínicos da doença. No entanto, a sensibilidade do teste foi significativamente maior (98%) nos cães

infectados e sintomático. Foi descrito por Queiroz Junior (2011), que o teste apresentou elevada sensibilidade somente para o diagnóstico de cães sintomáticos (88,9%); baixa sensibilidade foi observada em cães assintomáticos (12%) e oligossintomáticos (52,4%); porém o autor conclui que o teste pode ser usado para triagem sorológica do programa de controle da leishmaniose visceral canina.

Os resultados obtidos pelo teste DPP não mostraram reatividade para apenas uma amostra considerada positiva tanto pelo teste PCR utilizando-se o ITS1 quanto pelo PCR utilizando-se o kDNA como alvo intergênico, apontando para um baixo índice de resultados falso-negativos.

Os resultados obtidos a partir do teste molecular PCR quando utilizado como alvo intergênico ITS1 não demonstrou boa sensibilidade, não confirmando a positividade em nenhuma das amostras consideradas positivas pelo DPP, porém mostrou positividade em uma amostra negativa pelo teste DPP, o que pode ser relevante, uma vez que pode indicar a exposição desse animal ao parasita. Diferente do PCR(ITS1), o PCR utilizando-se como alvo intergênico o kDNA, teve sensibilidade de 100% quando utilizado para confirmação das quatro positivities demonstradas pelo teste DPP e também pela positividade demonstrada pelo PCR (ITS1), o que está de acordo com estudos anteriores em que Lachaud et al. (2002) avaliaram seis métodos de PCR em sangue periférico de cães com DNA de *L. infantum*, e obtiveram melhores resultados após a amplificação de kDNA por PCR. O melhor limiar de detecção da PCR a partir de DNA de cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* pode ser explicado pelo grande número de cópias de minicírculos de cinetoplasto presentes no parasita (Reale et al. 1999, Lachaud et al. 2002).

A baixa sensibilidade do PCR utilizado no presente estudo pode ser justificada de algumas formas, de modo geral, há grande variação na sensibilidade do método de PCR particularmente no que se refere ao método de extração de DNA utilizado, da escolha dos oligonucleotídeos iniciadores, das amostras clínicas utilizadas bem como do tempo de infecção e da parasitemia (Quinnell et al. 2001; Lachaud et al. 2002; Ikonopoulou et al. 2003; Manna et al. 2004). Em outras palavras, quando se trata de identificação precisa da espécie de *Leishmania* em amostras de sangue através do PCR, os ensaios podem requerer a necessidade de clonagem e sequenciamento dos produtos amplificados, devido à baixa sensibilidade de alguns alvos (representados em poucas cópias, ou mesmo em cópia única) e a pouca quantidade de parasitos presentes nas amostras. É reconhecido, que fatores adicionais

influenciam na sensibilidade da PCR, como por exemplo, o método empregado para extração de DNA, o número de cópias do DNA alvo da amplificação, assim como a variabilidade genética do alvo selecionado. Existem evidências que diferenças na eficiência de métodos de extração, influenciam significativamente na sensibilidade do ensaio molecular. Além disso, o processo de “otimização” de um protocolo baseado na PCR deve resultar em uma combinação perfeita entre o DNA extraído e as condições da PCR (Bastien et al. 2008).

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas em relação à idade, raça e sexo, o que corrobora com dados de Feitosa et al. (2000) e Gontijo & Melo (2004), em estudos dos fatores de risco para a leishmaniose canina no Brasil, já que não evidenciaram predisposição sexual, racial ou etária relacionada com a infecção.

Embora os resultados do presente estudo apontem para a inexistência de positividade entre os 169 dos 174 animais examinados, o encontro de quatro animais sororreagentes e uma positividade no PCR indica um provável contato com o parasita. Tal fato deve ser considerado em futuros inquéritos na região e em suas adjacências, no sentido de se confirmar ou não a circulação do agente etiológico na área.

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem uma contínua atenção sobre a importância dos cães atuando como reservatório doméstico da leishmaniose visceral, e dessa maneira, é relevante considerar os diferentes condicionantes envolvidos no processo de urbanização da doença, notadamente aqueles observados nas grandes cidades brasileiras. Neste sentido, acreditamos ser necessário empreender estudos com abordagens integradas, que contribuam para o planejamento e estratégias no escopo dos programas de controle.

9 – Conclusões

Embora o número de positivities tenham sido baixos em nossos estudos, o DPP demonstra ser uma boa ferramenta no diagnóstico da LV canina;

Houve sensibilidade de 100% no PCR utilizando-se como alvo intergênico o kDNA, para a confirmação das positivities demonstradas pelos testes DPP e ITS1.

O teste molecular PCR utilizando alvo gênico HSP70 não se apresentou sensível em nenhuma amostra analisada.

Os resultados sugerem uma atenção maior sobre o papel destes animais como reservatório dessa zoonose na região, entretanto os resultados não são conclusivos sobre as espécies de *Leishmania* circulantes entre os cães.

10 – Referências Bibliográficas

AGUILAR, CM.; RANGEL, EF.; DEANE, LM. Cutaneous leishmaniasis in frequent in equines from an endemic area in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986. 81(4):471-472.

AGUIAR, GM.; MEDEIROS, WM. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil, In: RANGEL, EF.; LAISON, R. Flebotomíneos no Brasil, Rio de Janeiro: Editora; Fiocruz 2003. 207-256.

ALBUQUERQUE et al. Evaluation of four molecular methods to detect *Leishmania* infection in dogs. Parasites & Vectors. 2017. 10:57.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, Javier. Canine Leishmaniasis. Advances in Parasitology, v. 2004.57: 2-88.

ALVAR, J.; VÉLEZ, ID.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PloSOne. 2012. 5(7): 1-7.

ALVES WA & BEVILACQUAPD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2004.20(1): 259-265.

ARAÚJO-PEREIRA T.; PITA-PEREIRA, D.; BOITÉ MC.; MELO M.; COSTA-REGO, TA.; FUZARI, AA.; BRAZIL, RP.; BRITTO C. First description of *Leishmania (Viannia)* infection in *Evandromyiasaulensis*, *Pressatia* sp. and *Trichophoromyiaauraensis* (Psychodidae: Phlebotominae) in a transmission area of cutaneous Leishmaniasis in Acre state, Amazon Basin, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2017. 112: 75-78.

BASANO, AS. & CAMARGO, LMA. Leishmaniose tegumentar americana: Histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Rev. Bras. Epidemiol. 2013. 7(3): 327-328.

BASTIEN, P.; PROCOP, GW.; REISCHL, U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008. 46(6): 1897–900.

BEZERRA-VASCONCELOS, DR.; MELO, LM.; ALBUQUERQUE, ES.; LUCIANO, MCS.; BEVILAQUA, CML. Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: Screening of target genes and assessment of quantitative methods. *Experimental Parasitology* 2011.129: 234–239.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informação de Saúde. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203> acessado em :28 de março de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Técnica conjunta no 01/2011- CGDT - CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Ministério da Saúde. 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, DF. 120. 2006.

BRAZIL, RP & BRAZIL, BG. Vetores na Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Conceição-Silva F, Alves CR. Leishmaniose do Continente Americano. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2014. 193-200.

BRAZIL, RP.; DE ALMEIDA, DC.; BRAZIL, BG.; MAMEDE, SMPO. Chicken House as a Resting Site of Sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitologia*. 1991. 33 (suppl.11): 113-117.

FUZARI, AA.; BRAZIL, RP.; DELMONDES, AFS.; MARRA, FA.; BARBOSA, VA. Presence of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in the Parque Estadual da Serra da Tiririca, State of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2016. 49(5).

FUZARI, AA.; BARBOSA, VA.; ANDRADE-FILHO, JD.; BRAZIL, RP. The sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phebotominae) of the Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2013.108 (7):943-946.

BRAZIL, RP.; FUZARI, AA.; ANDRADE FILHO, JD. Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas - A Mini Review. *Entomol Ornithol Herpetol*. 2015. (4):1-4.

BRAZIL, RP; BRAZIL, BG. Vetores na Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Conceição-Silva F, Alves CR. *Leishmaniose do continente americano*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2014. p.193-200.

BRAZIL, RP.; NASCIMENTO, MDSB.; MACAU, RP. Infecção natural do porco (*Sus scrofa*) por *Leishmania* em foco recente de leishmaniose tegumentar na Ilha de São Luís, Maranhão. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987. 82 (1): 145.

BRITO, CFP.; & PEREIRA, DP. Diagnóstico molecular da *Leishmaniaspp.* em flebótomos provenientes de áreas de ocorrência de leishmanioses. In Fátima Conceição, Carlos Roberto Alves. *Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz. 2014. 217- 231.

CABRERA C, GIMÉNEZ R, LÓPEZ MC. Determination of tea components with antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003. 51(15): 4427–4435.

CASTRO, EA.; THOMAZ-SOCCOL. V.; AUGUR, C.; LUZ E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the state of Paraná (Brazil). *Exp. Parasitol* 2007. 117: 13–21.

CARVALHO, GM.; BRAZIL, RP.; RÊGO, FD.; RAMOS, MC.; ZENÓBIO, AP.; ANDRADE FILHO, JD. Molecular Detection of *Leishmania* DNA in Wild-Caught Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) From a Cave in the State of Minas Gerais, Brazil. *J Med Entomol*. 2017. 54(1): 196-203.

CARVALHO, GM.; ANDRADE FILHO, JD.; FALCAO, AL.; ROCHA LIMA, AC.; GONTIJO, CM. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008. 8(3): 407-14.

CARVALHO M.R.; VALENÇA H.F; SILVA FJ; PITA-PEREIRA D.; PEREIRA T.A; BRITTO .C; BRAZIL R.P; BRANDÃO-FILHO S. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França,1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Tropica*. 2010. 116: 108– 110.

CÁSSIA-PIRES, R.; BOITÉ, MC.; D'ANDREA, OS.; HERRERA, HM.; CUPOLILLO, E, et al. Distinct *Leishmania* Species Infecting Wild Caviomorph Rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. PLoSNegl Trop Dis. 2014. 8(12): 3389.

CDC. Leishmaniasis. Centers for Disease Control and Prevention. 2015. Disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/>

COSTA CHN, PEREIRA HF, ARAÚJO MV. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. Rev Saúde Pública. 1990; 24:361-72.

COURA-VITAL, W.; KER, HG.; ROATT, BM.; AGUIAR-SOARES, RDO et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. PLoS ONE. 2013. 9(3): e91009.

CUPOLILLO, E.; BRAHIM, LR.; TOALDO, CB.; DE OLIVEIRA-NETO, MP.; DE BRITO, ME.; FALQUETO, A et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania(Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. J ClinMicrobiol. 2009.41(7):3126-32.

DANTAS-TORRES F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. VetParasitol 2007.149: 139–146.

DATASUS. Link <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>, acessado em outubro, 2017.

D'AVILA-LEVY, CM.; BOUCINHA, C.; KOSTYGOV, A.; SANTOS, HL. C.; MORELLI, KA.; GRYBCHUK-IEREMENKO, A.; DUVAL, L.; VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, V.; GRELLIER, P.; LUKE, J. . Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Online). 2015. 956-965.

DEANE, LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro. 1956. 1-162.

DE PAULA, CC.; FIGUEIREDO, FB.; MENEZES, RC.; MOUTA-CONFORT, E.; BOGIO, a.; MADEIRA, MF. Canine visceral leishmaniasis in Maricá, State of Rio de Janeiro: First report of na autochthonous case. Rev Soc Bras Med Trop. 2009 42 (1): 77-78.

DISH, J.; MACIEL, FC.; OLIVEIRA, MC.; ORSINI, M.; RABELLO, A. Detection of circulating *Leishmaniachagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2003. 97:1-5.

DOMINGOS, HI. Teste rápido TR-DPP no controle do diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina. [Dissertação de Mestrado]. Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2012.

DOURADO, ZF.; SILVA, HD.; SILVEIRA-LACERDA, EP.; GARCIA-ZAPATA, MTA. Panorama histórico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rk39). Revista de Patologia Tropical. 2007. 36(3):205-214.

EL TAI, NO.; OSMAN, OF.; EL FARI, M. PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2000. 94: 575–579.

FEITOSA, MM.; IKEDA, FA.; LUVIZOTO, MC.; PERRI, SH. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba- SP, Brasil. Clínica Veterinária. 2000. 5(28): 36-44.

FENECH FF. Leishmaniasis in Malta and the Mediterranean basin. Ann Trop Med Parasitol .1997. 91 (7): 747–753.

FIGUEIREDO, FB & MADEIRA, MF. Os parasitas e a questão da infecção em animais domésticos e domiciliados. In Fátima Conceição, Carlos Roberto Alves. Leishmanioses do Continente Americano. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz. 2014. 259-273.

FOLGUEIRA, C.; CAÑAVATE, C.; CHICHARRO, C.; REQUENA, JM. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. Parasitol 2007.134(3): 369-77.

FRAGA, J.; MONTALVO, AM.; De DONCKER, S.; DUJARDIN, JC.; VAN DER AUWERA, G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. Infect Genet Evol. 2010. 10: 238–245.

FRAGA, DB.; SOLCA, MS.; SILVA, VM.; BORJA, LS.; NASCIMENTO, EG et al. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray

dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease. *VetParasitol.* 2012. 190: 591– 594.

GALATI, EAB. Morfologia e Taxonomia. In: Rangel EF & Lainson R. *Flebótomos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2003. 23-206.

GARCIA, AL.; KINDT, A.; QUISPE-TINTAYA, KW.; BERMUDEZ, H.; LLANOS, A.; AREVALO, J.; BAÑULS, AL.; De DONCKER, S.; LE RAY, D.; DUJARDIN, JC. American Tegumentary Leishmaniasis: antigen- gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *InfectGenetEvol.* 2005.5(2): 109- 16.

GARCÍA, AL.; TELLEZ, T.; PARRADO, R.; ROJAS, E.; BERMUDEZ, H.; DUJARDIN, JC. Epidemiological monitoring of American Tegumentary Leishmaniasis: molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2007. 101 (12): 1208–1213.

GARCIA, L.; KINDT, A.; BERMUDEZ, H; LLANOS-CUENTAS, A.; De DONCKER, S.; AREVALO, J.; TINTAYA, KWQ.; DUJARDIN, JC. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004. 42: 2294-2297.

GENARO, O. Leishmaniose Visceral. In: NEVES, DP.; MELO, AI.; GENARO, O.; LINARDI, PM. *Parasitologia Humana*. 2003. 10: 56-72.

GIUNCHETTI, RC.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, CM.; CORREA-OLIVEIRA, R et al. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol.* 2006. 135: 100–107.

GONTIJO, B.; de CARVALHO MLR. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003. Jan-Feb 36 (1):71-80.

GONTIJO, CMF & MELO, MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e Perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.* 2004. 7(3): 338-349.

GONTIJO, CMF.; SILVA, ES.; FUCCIO, MB.; SOUSA, MCA.; PACHECO, RS.; DIAS, ES.; ANDRADE FILHO, JD.; BRAZIL, RP.; MELO, MN. Epidemiological studies of

an outbreak of 80 cutaneous Leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *ActaTropica*. 2002. 81(2): 143-150.

GRAÇA, GC.; VOLPINI, AC.; ROMERO, GA.; OLIVEIRA-NETO, MP.; HUEB, M.; PORROZZI, R.; BOITÉ, MC.; CUPOLILLO, E. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.2012.107(5): 664-74.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TEVA, A.; FERREIRA, AL.; Dos SANTOS, CB.; PINTO, IS.;deAZEVEDO, CT.; et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R SocTropMedHyg*. 2012.106:54-9.

GUARGA, J L.; MORENO, J.; LUCIENTES, J.; GRACIA, MJ.; PERIBÁÑEZ, MA.; CASTILLO, JA. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2000. 88: 13–2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. From: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1961&id_pagina=1. 2007.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOULIS, VG. Molecular diagnosis of Leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *VeterinaryParasitology*. 2003 113 (2): 99-113.

JORGE, RSP.; ROCHA, FL.; MAY JUNIOR, JA.; MORATO, RG. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. *OecologiaAustralis*. 2010. 14(3):686-710.

LACHAUD, L.; MARGCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DREREURE, J.; DEDET, JP.;BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002. 40(11): 210-215.

LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the Leishmaniasis. *PhilosTrans R SocLond B BiolSci*. 1988. 321(1207): 389-404.

LAISON, R & RANGEL, EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006. 100(8):811-27.

LEAL, CRB. Métodos disponíveis e possíveis para diagnóstico da leishmaniose visceral americana canina. Boletim Epidemiológico Paulista. 2009. 6(690): 14-18.

LEANDRO JUNIOR, MV de S. Análise comparativa do teste imunocromatográfico DPP- Biomanguinhos com ELISA e RIFI no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo. Universidade de São Paulo, 2014.

LEMOS, EM et al. Canine Visceral Leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test in dogs with and without signs of the disease. Acta Trop. 2008. 104(7): 205.

MADEIRA, MF.; MARZOCHI, MCA.; SCHUBACH, AO; SCHUBACH, TMP.; PACHECO, RS.; OLIVEIRA, FS. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) brasiliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2006. 100: 442-445.

MADEIRA, MF.; SERRA, CB.; UCHÔA, CA.; da CRUZ, DAM.; PERDOMO, CC. Leishmaniose canina: avaliação sorológica de 310 cães na Região de Itaipu, Rio de Janeiro. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2000. 16(2): 568.

MADEIRA, MF.; UCHOA, CMA.; LEAL, CA.; SILVA, RMM.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, CM.; SERRA, CMB. *Leishmania (Viannia) brasiliensis* em cães naturalmente infectados. Ver Soc. Bras. Med. Trop. 2003. 36(5):551-555.

MAIA, C & CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniosis and immune response to infection. Veterinary Parasitology. 2008. 15(4): 274-287.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, LM.; MORTE, RD.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. Veterinary Parasitology. 2004. 125(3): 251-262.

MAPA REGIÕES ADMINISTRATIVAS DE NITERÓI.
http://www.webbusca.com.br/pagam/niteroi/niteroi_mapas.asp acessado em 29/01/2018.

MARZOCHI, MC MARZOCHI, KB. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil : Emerging antropozoonosis and possibilities for theis control. 1994.

MASSUNARI, GK.; VOLTARELLI, EM.; DOS SANTOS. DR.; DOS SANTOS, AR.; POIANI, LP.; OLIVEIRA, O.,;ET AL. A serological and molecular investigation of American cutaneous leishmaniasis in dogs, three years after an outbreak in the Northwest of Paraná State, Brazil. Cad SaudePubl 2009. (25)1: 97-104.

MILES, MA.; VEXENAT, JA.; FURTADO CAMPOS, JH.; FONSECA DE CASTRO, JA. Canine Leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral Leishmaniasis.In: International Canine Leishmaniasis Forum. 1999. 46-53.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2017 <http://www.brasil.gov.br/saude/2017/08/casos-de-leishmaniose-caem-no-pais-mas-doenca-ainda-requer-atencao>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, DF. 2006. 2aed. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Visceral. Brasília, DF. 2015. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2016. Nota técnica. <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/setembro/23/NT-informativa-ilteforan-002-...pdf>. Acessado em 10/06/2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL. Departamento de informática do SUS (DATASUS); 2012. <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>

MIRANDA, JC.; REIS, E.; SCHRIEFER, A.; GONCALVES, M.; REIS, MG.; CARVALHO, L.; FERNANDES MIRANDA, LM.; ANDRADE, LH.; et al. Leishmaniose mucosa: Aspectos clínicos e epidemiológicos. Ver. Bras. 2007. 73(6): 843-847.

MIRANDA, JC.; REIS, L.; SCHRIEFER, A.; GONÇALVES, M.; REIS, MG.; CARVALHO.; FERNANDES, O.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A. Frequency of infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with *Leishmania brasiliensi* sin a Brazilian endemic área as assessed by pinpoint capture and polimerase chainreaction. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.2002. 97: 185-188.

MISSAWA, NA.; VELOSO, MAE.; MACIEL, GBML.; MICHALSKY, EM.; DIAS, ES. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no Município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. RevSocBrasMed Trop. 2011; 44(1): 76-78.

MITTLER M, et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent, as immunofluorescent- antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and get tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dog. Journal Clinical Microbiology. 2005. 43(11):5515-5519.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN ANDRES, M.; GONZALES, F.; CASTILLO, J.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1994. 88: 491-493.

MORENO, J.; ALVAR J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol. 2002. 18: 399–405.

NERY-GUIMARÃES, F.; DAMASCENO, R.; AZEVEDO M. Leishmaniose tegumentar – zoonose de roedores silvestres na Amazônia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1968. 66(2): 151-168

NICOLLE, C. Isolamento e cultura de escorpos de Leishman. Archives de l'Institut Pasteur de Tunis. 1908. 3:55-56.

NIEVES, E & PIMENTA, PFP. Development of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in the sandfly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology. 2000. 37(1):134-140.

NOVY, FG & MCNEAL, WJ. The cultivation of *Trypanosoma brucei*: A preliminary note. The Journal of the American Medical Association. 1903. 41:1266-1268.

NUNES, VMA. Prevalência da Leishmaniose Visceral e georreferenciamento da população de cães domésticos (*Canis familiaris*) no Parque Estadual da Serra da Tiririca – RJ. [Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária]. Niterói-RJ: Universidade Federal Fluminense. 2015. 63.

OLIVEIRA, AC.; FIGUEIREDO, VLS.; SANTOS, FN.et al., Investiga o de caso de leishmaniose visceral canina na região do Jacaré, Niter , Rio de Janeiro, Brasil. Rev. Med. Trop de São Paulo. 2015. 57(4): 325-332.

OLIVEIRA, FS.; PIRMEZ, C.; PIRES, MQ.; BRAZIL, RP.; PACHECO RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. VetParasitol. 2005. 129:219-227.

OLIVEIRA, AC. Investiga o de caso autóctone de leishmaniose visceral canina na região de Jacaré, município de Niter , Rio de Janeiro. Disserta o de Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Funda o Oswaldo Cruz.2013. Rio de Janeiro. RJ. 97.

PAIVA. BR.; SECUNDINO, NFC.; NASCIMENTO, JC.; PIMENTA, PFP.; GALATI, EAB.; ANDRADE JUNIOR, HF.; MALAFRONTA, RS. Detection and identification of *Leishmania* species in field- captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. Acta Tropica.2006.99: 252– 259.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Informe epidemiológico das Américas. Leishmanioses. 2018 – www.paho.org. Acessado em 02/03/2018.

PMN – Prefeitura Municipal de Niter . 2000. Acessado em Agosto de 2017 em www.niteroi.rj.gov.br.

PENNISI, MG. Case report of Leishmaniasis in four cats. Veterinary Research Communications. 2004. 28(1): 363-366.

PEREZ, JE.; OGUSUKU, E.; INGA, R.; LOPEZ, M.; MONJE, J.; PAZ, L.; NIETO, E.; AREVALO, J.; GUERRA, H. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1994. 88(2):161-4.

PEREZ, JE.; VELAND, N.; ESPINOSA, D.; TORRES, K.; OGUSUKU, E.; LLANOS-CUENTAS, A.; GAMBOA, D.; AR VALO, J. Isolation and molecular identification of *Leishmania (Viannia) peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera:Psychodidae) in the Peruvian Andes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2007. 102(5): 655-658.

PIMENTA, PFP.; SECUNDINO, NFC.; BLANCO, EEN. Interação Vetor-Hospedeiro. In: Rangel EF & Lainson R. Flebótomos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2000. 275-289.

PITA -PEREIRA, D.; SOUZA, GD.; ZWETSCH, A.; ALVES, CR.; BRITTO, C.; RANGEL, EF. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of South Brazil using a multiplex PCR assay. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2009. 80(4): 593-595.

PITA-PEREIRA, D.; ALVES, CR.; SOUZA, MB.; BRAZIL, RP.; BERTHO, A.; BARBOSA A.; BRITTO, C. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2005. 99: 905 – 913.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, MAB.; ALVES, CR.; BRAZIL, RP.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* using PCR multiplex assay in an endemic area of visceral Leishmaniasis in Brazil. Acta Tropica. 2008. 107(1):66-9.

PITA-PEREIRA, D.; LINS, R.; OLIVEIRA, MP.; LIMA, RB.; PEREIRA, BAS.; MOREIRA, OC.; BRAZIL, RP.; BRITTO, C. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral Leishmaniasis Parasites & Vector. 2012. 5:15.

PITA-PEREIRA, D.; SOUZA, GD.; PEREIRA, TA.; ZWETSCH, A.; BRITTO, C.; RANGEL, EF. *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American Cutaneous Leishmaniasis: Detection of natural infection by *Leishmania (Viannia)* DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. Acta Tropica .2011.120(3):273-5.

PITTNER, E.; VOLTARELLI, E.; PERLES, TF.; ARRAES, SMAA.; SILVEIRA, TGV.; LONARDONI, MVC. Ocorrência de leishmaniose tegumentar em cães de área endêmica no Estado do Paraná. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2009. 61(3):561-565.

PONTES, MCQ. Estudo dos Vetores da Leishmaniose na região fitogeográfica de Saquarema, Estado do Rio de Janeiro. [Monografia]. Rio de Janeiro: Faculdade São José. 2008.

QUARESMA, PF.; RÊGO FD.; BOTELHO, HÁ.; DA SILVA, SR.; MOURA JUNIOR, AJ.; TEIXEIRA NETO, RG.; MADEIRA, FM.; CARVALHO, MB.; PAGLIA, AP.; MELO, MN.; GONTIJO, CM. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in na endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. Trans R SocTropMedHyg. 2011. 105(10): 579-85.

QUEIROZ JUNIOR, EM. Validação do teste imunocromatográfico rápido dual path platform para o diagnóstico da leishmaníase visceral canina. [Dissertação apresentada ao programa de pós- graduação em Ciências Veterinárias]. Fortaleza – Ceará. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ. 2011. 45-47.

QUINNEL, RJ.; COURTENAY, O.; SHAW, MA. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. Journal of Infectious Diseases. 2001b. 183: 1421-1424.

QUINNELL, RJ.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, JJ.; SHAW, MA.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. Parasitology. 2001a. 122(3): 253- 261.

RANGEL, E.F. & LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz . 2009. 104: 937–954.

RANGEL, EF & VILELA, ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cadernos de Saúde Pública. 2008. 24(12): 2948-2952.

RASSI, Y.; DEHKORDI, AS.; OSHAGHI, MA.; ABAI, MR.; MOHTARAMI, F.; ENAYATI, A.; ZAREI, Z.; JAVADIAN, E. First report on natural infection of the *Phlebotomus tobbi* by *Leishmania infantum* in northwestern Iran. Experimental Parasitology. 2012. 131: 344–349.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLOSRIOSOS, NS.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *Journal of Clinical Microbiology*.1999. 37(9): 2931-2935.

REITHINGER, R & DAVIES, CR. Is the dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American Cutaneous Leishmaniasis. A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg* 1999. 61:530-41.

RYAN, PR.; ARANA, BA.; RYAN, JR.; WIRTZ, RA.; WORTMANN, GW.; RIZZO, NR. The domestic dog, a potential reservoir for *Leishmania* in the Peten region of Guatemala. *VetParasitol* 2003. 115: 1–7.

ROGRIGUES, AF.; BARBOSA, VA.; ANDRADE-FILHO, JD.; BRAZIL, RP. The sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2013. 108(7): 943-946.

ROMERO, GA & BOELART, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America - A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 4(1): e584. doi:10.1371/journal.pntd. 2010.

SALADIA, LFV. O papel da estrutura fundiária, das normativas e dos paradigmas urbanísticos na configuração espacial da Região Oceânica de Niterói. Rio de Janeiro. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Programa de Pós-Graduação em Urbanismo da Faculdade de Arquitetura e Urbanismo. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2001.

SANTOS, RV. & COIMBRA, JRCEA. Saúde e Povos Indígenas Rio de Janeiro: 1994, Ed.FIOCRUZ. 1994. p251.

SANTOS, SO.; ARIAS, J.; RIBEIRO, AA.; HOFFMANN, MP.; FREITAS, RA.; MALACCO, MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1998. 12: 315-317.

SHARMA, U & SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*. 2008. 45(4): 255-72.

SHERLOCK, IA.; MIRANDA, JC.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI JUNIOR, G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1984. 79(4): 511.

SILVA, DT.; STARKE-BUZETTI, WA.; ALVES MARTINS, MF.; PAIXÃO, M dos S.; TENÓRIO, M da S.; LOPES, MLM. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2014.23(2): 179-186.

SILVEIRA, AP. Distribuição territorial da dengue no município de Niterói, 1996 a 2003 [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, 2005.

SILVEIRA, FT.; ISHIKAWA, EA.; de SOUZA, AAA.; LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará state, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon Region. *Parasite*. 2002. 9: 43-50.

SILVEIRA, FT.; LAINSON, R.; BRITO, AC.; OLIVEIRA, MRF.; PAES, MG.; de SOUZA, AAA.; SILVA, BM. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão RNQ. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico, Belém: Editora CEJUP, 1997.

SINAN – Sistema de informação de agravo de notificação. Leishmanioses. 2017. Acessado em 18 de abril de 2017. <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar-americana-lta/11328-situacao-epidemiologica-dados>.

SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; et al. *Leishmania infantum*-specific IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic area. Evolution in the course of infection and after treatment. *Veterinary Parasitology*. 2001. 96: 265-276.

SOUZA, AL. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonenses* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2005. 128 (1-2): 41-45.

SOUZA-ROCHA, L.; SANTOS, CB.; FALQUETO, A.; GRIMALDI, GJ.; CUPOLILLO, E. Molecular biological identification of monoxenoustrypansomatids and *Leishmania* from anthropophilic sand flies (Diptera: Psychodidae) in Southeast Brazil. *Parasitology Research*. 2010. 107:465–468.

SOUZA, NP.; ALMEIDA, A.; FREITAS, TPT.; PAZ, RCR. et al. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010. 43(3): 333-335.

SOUZA, CF.; BORGES, MAS.; ANDRADE, AJ. Contribution to the Knowledge of the Phlebotomine Sand Flies Fauna (Diptera: Psychodidae) of Timóteo Municipality, Minas Gerais, Brazil. *Neotropical Entomology*. 2009. 38(2): 267-271.

TELES, CBG.; MEDEIROS, JF.; dos SANTOS, APA.; de FREITAS, LAR.; KATSURAGAWA, TH.; CANTANHÊDE, LM.; et al. Molecular characterization of American Cutaneous Leishmaniasis in the triborder area of Assis Brasil, Acre state, Brazil. *Ver Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015. 57(4): 343-7.

TELES, CBG.; SANTOS, APA.; FREITAS, RA.; OLIVEIRA, AFJ.; OGAWA, GM.; RODRIGUES, MS.; PESSOA, FAC.; MEDEIROS, JF.; CAMARGO, LMA. Phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) diversity and their *Leishmania* DNA in a hot spot of American Cutaneous Leishmaniasis human cases along the Brazilian border with Peru and Bolivia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111. 2016. 423-432.

TRAVI, BL.; TABARES, CJ.; CADENA, H. *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in two Colombian dogs: a note on infectivity for sand flies and response to treatment. *Biomedica* 2006. 26 (1): 249–253.

UCHÔA, CMA.; SERRA, CMB.; DUARTE, R. et al. Serological and epidemiological aspect of canine American tegumentary Leishmaniasis from Maricá, Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2001. 34(6): 563-568.

VALDIVIA, HO.; de LOS SANTOS, MB.; FERNANDEZ, RG.; BALDEVIANO, C.; ZORRILLA, VO.; VERA, H.; LUCAS, CM.; EDGEL, KA.; LESCANO, AG.; MUNDAL, KD.; GRAF, PCF. Natural *Leishmania* Infection of *Lutzomyia auraensis* in Madre de Dios, Peru, Detected by a Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Real-Time Polymerase Chain Reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012. 87(3): 511–517.

WERNECK, GL. Editorial: Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2010. 26(4): 644-645.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2016. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/Leishmaniasis/en/>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2018. Leishmaniasis. Disponível em http://www.who.int/gho/neglected_diseases/Leishmaniasis/en/. Último acesso em 10 02 2018.

YANG, S & ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infection diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. 2004. *Lancet* 4: 337-348.

YOUNG, DG & DUCAN MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*. 1994. 881p.

ZAMPIERI R.A., LARANJEIRA-SILVA M.F., MUXEL S.M., STOCCO DE LIMA A.C., SHAW J.J., FLOETER-WINTER L.M. High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016. 10(2): e0004485.

ZANETTE, MF. Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para diagnóstico de leishmaniose [Dissertação de Mestrado]. Universidade Estadual Paulista, 2006.

NUNES, VM.; ROCHA, MR.; SANTOS, CS.; BORGES, FV.; MOUTINHO, FF. Situação da Leishmaniose Visceral Canina no município de Niterói, RJ (2011-2014). Centro de Controle de Zoonoses - Niterói/RJ.2015

11- ANEXO

11.2 – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Diagnóstico da leishmaniose canina por técnicas sorológica e molecular na região oceânica de Niterói – RJ.

Nome do pesquisador principal: Reginaldo Peçanha Brazil

Razão Social da instituição da CEUA que aprovou: Instituto Oswaldo Cruz - CIAEP nº 01.0234.2014

Objetivos do estudo:

- 1) Utilizar o teste rápido (DPP) como triagem da infecção canina.
- 2) Utilizar o teste molecular (PCR) para confirmação da infecção canina.
- 3) Realizar o sequenciamento para identificar a espécie de *Leishmania* spp. na infecção canina.

Procedimentos a serem realizados com os animais:

Após a contenção física do animal, será realizado a coleta de sangue periférico das veias radial. O procedimento será realizado uma única vez no projeto.

Os animais serão mantidos junto com o proprietário durante todo o período de coleta. Caso o cão seja positivo o proprietário será informado e o Centro de Controle de Zoonoses local também será informado para que o mesmo proceda com as providencias necessárias e de acordo com o estabelecido pelo órgão de controle.

Potenciais riscos para os animais:

Os procedimentos adotados não apresentam riscos para os cães, além de todo o procedimento ser acompanhado pelo Médico Veterinário responsável.

Cronograma:

Composto apenas de uma fase que é a coleta do sangue periférico, até completar o número máximo de 200 cães. Será iniciada assim que for estabelecido a autorização da CEUA, e terminara quando completar coleta de sangue de 200 cães.

Benefícios:

Em inúmeros focos de leishmanioses descritos no mundo, observa-se uma grande variedade de animais mamíferos incriminados como possíveis reservatórios ou hospedeiros acidentais. Entre os animais domésticos descritos envolvidos no ciclo de transmissão de diferentes espécies de *Leishmania*, o cão (*Canis familiaris*) apresenta papel de destaque. Esse animal tem naturalmente sido encontrado infectado por diferentes espécies de *Leishmania* o que torna importante investigar a infecção em cães por esse parasito. (Figueiredo & Madeira, 2014). Em função da simpatria da leishmaniose visceral e da leishmaniose tegumentar canina numa mesma região e aspectos clínicos semelhantes, os dados clínicos como o diagnóstico devem ser interpretados com cautela, já que a leishmaniose visceral e a leishmaniose tegumentar podem se confundir (Figueiredo & Madeira, 2014), mostrando-se importante uma correta diferenciação no diagnóstico das leishmanioses.

Em relação a participação dos cães enquanto reservatório doméstico, é importante relatar que seu papel na transmissão do agente da leishmaniose visceral já é reconhecido, porém não se pode afirmar que sejam um reservatório também na transmissão do agente da leishmaniose tegumentar, pois não há evidências científicas que comprovem o seu papel como reservatório (Gontijo et al. 2002; Madeira et al. 2003). Porém a constatação da leishmaniose tegumentar canina sob as formas sintomática e subclínica em regiões onde também ocorreram casos humanos sugere que o cão pode representar algum papel na cadeia de transmissão da leishmaniose tegumentar (Madeira et al. 2006), o que torna importante investigar a infecção por *Leishmania* sp. em cães (Pittner et al., 2009).

No presente estudo se propõe a utilização de ferramentas de sorologia e biologia molecular para auxiliar em uma correta diferenciação no diagnóstico das leishmanioses.

O estudo a ser desenvolvido na cidade de Niterói, estado do Rio de Janeiro, se justifica uma vez que há indícios da circulação de espécies de *Leishmania* que provocam tanto leishmaniose visceral quanto leishmaniose tegumentar, dados esses que são demonstrados no site do ministério da saúde, onde foram notificados 18 casos de leishmaniose tegumentar humano entre os anos de 2001 e 2015, e 2 casos de leishmaniose visceral humano 2003 e 2007 (Brasil, 2017). Soma-se às informações do Ministério da Saúde, o registro *Lutzomyia longipalpis*, vetor da leishmaniose visceral, *Nyssomyia intermedia* e *Migonemyia migonei*, ambas espécies vetores da leishmaniose tegumentar, e os estudos relatando o diagnóstico de leishmanioses em cães de Niterói (Madeira et al. 2000; Madeira et al. 2003; Fuzari et al. 2013; De Paula et al. 2009; Oliveira et al. 2015)

Esclarecimentos ao proprietário sobre a participação do animal neste projeto:

Sua autorização para a inclusão de seu animal neste estudo é voluntária.

A confidencialidade dos seus dados pessoais serão preservadas.

Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações e, nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

Um médico veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será a Dra. Caroline Magalhães Cunha, inscrito(a) no CRMV-RJ sob o no 11.099. Além dela, e a equipe do Pesquisador Principal, Dr. Reginaldo Peçanha Brazil, também se responsabilizará pelo bem-estar do(s) seu(s) animal(is) durante a coleta do sangue periférico. Caso necessário, após a coleta, você poderá entrar em contato com a equipe pelo contato:

Equipe: Dr. Reginaldo Brazil, Dra. Caroline Magalhães Cunha, Cristian Ferreira de Souza, Monique Ferreira Portella.

Endereço: Av. Brasil 4365 - Manguinhos – Rio de Janeiro/RJ – CEP: 21040-900

Telefone: (21) 25621468

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is), identificado(s) a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e a outra com o pesquisador.

(Cidade), dd/mm/aaaa

Assinatura do Responsável Assinatura do Pesquisador

Responsável

Nome:

Documento de Identidade:

(quando aplicável)

Identificação do(s) animal(is)

(repetir tantas vezes quantos forem os animais)

Nome:

Número de identificação:

Espécie:

Raça:

11.2 - CEUA



Instituto Oswaldo Cruz
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

LICENÇA

L-017/2017

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-014/2017), intitulado "Diagnóstico da leishmaniose canina por técnicas sorológica e molecular na região oceânica de Niterói – RJ", sob a responsabilidade de REGINALDO PEÇANHA BRAZIL atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 31/03/2019 e inclui o uso total de:

Animal	espécie e linhagem	quant (total)	♂	♀	idade	peso	origem (*)
Outros	<i>Canis familiaris</i>	200			<3 meses		Serão utilizados cães atendidos na clínica Health Veterinary Center do município de Niterói. Outros locais poderão ser incluídos em virtude de políticas locais que alterariam o cronograma do projeto.

Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 02 de maio de 2017.

Flávio Alves Lara

Coordenador da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056