

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*  
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

AMANDA CARDOZO DA ROSA

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA TÉCNICA DE IMUNO-  
HISTOQUÍMICA USANDO *CELL-BLOCK* DE ASPIRADOS DE MEDULA ÓSSEA  
PARA DETECÇÃO DE *Leishmania* spp. EM CÃES NATURALMENTE  
INFECTADOS**

Rio de Janeiro

2020

AMANDA CARDOZO DA ROSA

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA TÉCNICA DE IMUNO-  
HISTOQUÍMICA USANDO CELL-BLOCK DE ASPIRADOS DE MEDULA ÓSSEA  
PARA DETECÇÃO DE *Leishmania* spp. EM CÃES NATURALMENTE  
INFECTADOS**

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação  
em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do  
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas  
para obtenção do grau de Mestre em Ciências.  
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Caldas Menezes

Rio de Janeiro  
2020

**A Deus e a todos os bichanos que permearam minha vida de amor...**

## AGRADECIMENTOS

Albert Einstein afirmou, certa vez, que “Deus não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança!”. Diante dessa reflexão, eu gostaria de agradecer a Deus por ter confiado a mim essa grande responsabilidade, mas principalmente por ter escolhido cada pessoa que esteve ao meu lado durante esses dois anos. Sou muito grata por conseguir finalizar meu mestrado acadêmico onde eu sempre quis, nesta instituição centenária e qualificada que é o Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fiocruz.

Obrigada ao meu orientador Rodrigo Menezes, que apesar das inúmeras atividades se mostrava sempre solícito e compreensivo diante dos desafios e imprevistos.

Obrigada aos estatísticos Wagner Tassinari e Raquel Oliveira pela acessibilidade e retorno no nosso prazo iminente.

Obrigada à atenciosa Luísa Miranda, que conseguia pacientemente nortear minha dissertação com importantes sugestões, apesar da rusticidade dos meus textos.

Obrigada aos estagiários e pesquisadores do Lapclin-Dermzoo, INI, sempre gentis e prestativos.

Obrigada a todos do Serviço de Anatomia Patológica, INI, dedicados e parceiros na corrida rotina de conciliação entre as disciplinas e as atividades de coleta e clivagem.

Obrigada aos funcionários da Secretaria de Ensino do INI, especialmente à Priscilla Sá e ao pessoal da portaria. Vou guardar as melhores lembranças do Sr. Rivaldo (*in memoriam*) dividindo suas guloseimas e conversando comigo quando eu ficava até mais tarde, no computador do corredor da secretaria.

Obrigada ao meu namorado Rodrigo Tavares e à minha família pelo amor e paciência.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do mestrado e pela bolsa disponibilizada.

E, lógico, não poderia deixar de agradecer aos meus ‘best-friends’: Bruna Guedes, Yago Côrtes e Lucas Vinicius. Mais que companheiros de disciplinas, vocês são companheiros de vida!

**“A dúvida é a ante-sala do conhecimento.”**  
**Provérbio chinês**

ROSA, A.C. Avaliação da sensibilidade da técnica de imuno-histoquímica usando *Cell-block* de aspirados de medula óssea para detecção de *Leishmania* spp. em cães naturalmente infectados. 91f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2020.

## RESUMO

A leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) é uma doença de ampla distribuição no Brasil causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, que acomete humanos, animais domésticos e silvestres. O cão (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório doméstico desse protozoário. Nos últimos anos, têm sido verificados novos casos de LVZ em cães de diversas áreas, onde não existiam registros da doença. Nesse sentido, a busca por técnicas de diagnóstico mais sensíveis e específicas com aplicação a campo, bem como de amostras biológicas com elevada carga parasitária, a exemplo da medula óssea, é fundamental para um diagnóstico prático, seguro e eficiente. Desta forma, o emprego da técnica de imuno-histoquímica usando *cell-block* de aspirados de medula óssea (IHQCB) mostra-se uma alternativa promissora, cuja sensibilidade deve ser avaliada. Portanto, os objetivos desse estudo foram avaliar a sensibilidade da técnica de IHQCB e a sensibilidade da técnica de imuno-histoquímica em amostras de medula óssea de fragmento do osso esterno (IHQOE), usando como padrão de referência a técnica de cultura parasitológica (CP). Foi incluída no estudo uma amostra de conveniência de 84 cães, provenientes do município de Barra Mansa entre 2013 e 2019, soropositivos para *L. infantum* e com confirmação da infecção por esse parasito em CP de pele, baço, medula óssea ou linfonodo. Os resultados mostraram que a técnica de IHQOE detectou formas amastigotas em casos negativos de CP de medula óssea e a sua frequência de positividade de 65,5% (IC=95%: 54,2%; 75,3%) em relação à CP de pele, baço, linfonodo ou medula óssea, foi superior à frequência de positividade de 31% (IC=95%, 21,6%; 42,1%) da técnica de IHQCB na detecção de formas amastigotas de *L. infantum*. As frequências de positividade para a IHQCB, na presença ou ausência de sinais clínicos, foram 29,7% e 40,0%, respectivamente, tendo a positividade da CP de medula óssea, pele, linfonodo ou baço como referência. Já para as amostras de fragmento de osso esterno, 58,3% foram positivas na presença de sinais clínicos, enquanto 60,0% das amostras foram positivas na ausência de sinais clínicos. Desta forma, apesar de possuir potencial de utilização como técnica parasitológica de rotina no diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães pela praticidade na coleta e preservação da amostra, a técnica de IHQCB apresentou uma baixa sensibilidade na detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. e necessita de ajustes em seu protocolo.

**Palavras-chave:** Leishmaniose visceral. *Leishmania infantum*. Cães. *Cell-block*. Imuno-histoquímica. Medula óssea.

ROSA, A.C. **Sensitivity evaluation of an immunohistochemical technique using cellblock from bone marrow aspirates for the detection of *Leishmania* spp. in naturally infected dogs.** 91f. Dissertation [Master in Clinical Research in Infectious Diseases] - Oswaldo Cruz Foundation, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Rio de Janeiro, 2020.

## ABSTRACT

A Zoonotic visceral leishmaniasis (LVZ) is a disease of wide distribution in Brazil caused by the protozoan *Leishmania infantum*, which affects humans, domestic and wild animals. The dog (*Canis familiaris*) is considered the main domestic reservoir of this protozoan. In recent years, new cases of LVZ have been observed in dogs from different areas, where there were no records of the disease. Thus, the search for more sensitive and specific diagnostic techniques with application in the field, as well as biological samples with high parasitic load, such as bone marrow, is essential for a practical, safe and efficient diagnosis. Thereby, the use of immunohistochemistry using *cell-block* of bone marrow aspirates (IHCCB) is a promising alternative, whose sensitivity must be evaluated. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the sensitivity of the IHCCB and the sensitivity in bone marrow samples from a fragment of the sternum bone (IHCSB), using the parasitological culture (PC) technique as a reference standard. A convenience sample of 84 dogs from the municipality of Barra Mansa between 2013 and 2019, serologically positive for *L. infantum* and with confirmation of the infection by this parasite in PC of skin, spleen, bone marrow or lymph node was included in the study. The results showed that the IHCSB detected amastigotes forms in negative cases of bone marrow PC and its frequency of positivity of 65.5% (CI = 95%, 54.2%; 75.3%) in relation to culture parasitological analysis of skin, spleen, lymph node or bone marrow, was superior to the frequency of 31% (CI = 95%, 21.6% to 42.1%) of positivity using IHCCB in the detection of amastigotes forms. The frequencies of positivity for IHCCB, in the presence or absence of clinical signs, were 29.7% and 40.0%, respectively, with the positivity of the PC of bone marrow, skin, lymph node or spleen as reference. For the samples of the sternal bone fragment, 58.3% were positive in the presence of clinical signs, while 60.0% of the samples were positive in the absence of clinical signs. Thus, despite having potential for use as a routine parasitological technique in the diagnosis of infection by *L. infantum* in dogs due to the practicality in collecting and preserving the sample, the IHCCB technique showed a low sensitivity in the detection of amastigote forms of *Leishmania* spp. and needs adjustments to its protocol.

**Keywords:** Visceral leishmaniasis. *Leishmania infantum*. Dogs. *Cell-block*. Immunohistochemistry. Bone marrow.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fêmea de flebotomíneo realizando repasto sanguíneo em pele humana.....	17
Figura 2	Ciclo biológico da leishmaniose visceral zoonótica.....	19
Figura 3	Casos notificados como LV no Rio de Janeiro entre 2007 e 2017.....	22
Figura 4	Manifestações clínicas da LVZ em cães: úlceras (A), alopecia (B), descamação furfurácea (C) e onicogribose (D).....	25
Figura 5	Punção aspirativa de medula óssea em cão .....	48
Figura 6	Fluxograma de procedimentos para coleta de amostras e exames laboratoriais	49
Figura 7	Fragmentos de osso esterno contendo medula óssea.....	49
Figura 8	Formação de capa leucocitária após centrifugação do aspirado de medula óssea.....	50
Figura 9	Descarte adequado da solução fixadora <i>cell-block</i> .....	51
Figura 10	Deslocamento do <i>cell-block</i> de medula óssea do tubo de EDTA: <i>cell-block</i> sendo pressionado com a ponta da pinça (A), utilização da pinça para efetuar leves batidas no tubo invertido com a amostra em iminente descolamento (B) e amostra pronta para clivagem (C).....	51
Figura 11	Desbastamentos laterais do <i>cell-block</i> de medula óssea (A e B) e secção mediana na clivagem .....	51
Figura 12	Aspecto do <i>cell-block</i> de medula óssea após clivagem .....	52
Figura 13	Etapas da clivagem de amostra de osso esterno: fragmento obtido após a necropsia (A), retirada do gradil costal e da musculatura inerentes (B) e corte seccional evidenciando a medula óssea (C).....	52
Figura 14	Osso esterno clivado no interior do cassete (A) e acondicionado com reserva em formalina (B).....	53
Figura 15	Osso esterno durante o processo de descalcificação em ácido nítrico.....	53
Figura 16	Fluxograma de amostras selecionadas entre 2013 e 2019.....	57
Figura 17	Corte histológico de <i>cell-block</i> de medula óssea de cão mostrando formas amastigotas coradas em castanho, no interior dos macrófagos em capa leucocitária, em objetiva de 4x (A) e 40x (B). Imuno-histoquímica .....	58

Figura 18	Corte histológico de fragmento de osso esterno de cão contendo medula óssea, mostrando formas amastigotas coradas em castanho no interior de macrófagos em objetiva de 40x. Imuno-histoquímica .....	<b>58</b>
Figura 19	Boxplot mostrando a associação entre idade (meses) e positividade na IHQCB	<b>63</b>
Figura 20	Boxplot mostrando a associação entre idade (meses) e positividade na IHQOE.....	<b>63</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Técnicas de diagnóstico x Frequências de positividade nas amostras de medula óssea com respectivo padrão de referência.....	43
Tabela 2	Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de <i>L. infantum</i> pelas técnicas de IHQ em amostras de medula óssea de cães com infecção por <i>L. infantum</i> confirmada pela cultura parasitológica.....	59
Tabela 3	Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de <i>L. infantum</i> pela técnica de IHQ em <i>cell-block</i> de aspirados e medula óssea (MO) de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos, com a presença de <i>L. infantum</i> confirmada pela cultura parasitológica positiva para pele, linfonodo, baço ou MO.....	59
Tabela 4	Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de <i>L. infantum</i> pela técnica de IHQ em amostras medula óssea em fragmentos de osso esterno de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos, em cães com infecção por <i>L. infantum</i> confirmada pela cultura parasitológica de pele, baço, MO ou linfonodo.....	60
Tabela 5	Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de <i>L. infantum</i> pelas técnicas de IHQ em <i>cell-block</i> de aspirados de medula óssea e IHQ de amostras medula óssea em fragmentos de osso esterno de cães com infecção por <i>L. infantum</i> confirmada pela cultura parasitológica de medula óssea.....	60
Tabela 6	Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de <i>L. infantum</i> pela técnica de IHQ em <i>cell-block</i> de aspirados de medula óssea de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos, em cães com infecção por <i>L. infantum</i> confirmada pela cultura parasitológica de medula óssea.....	61
Tabela 7	Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de <i>L. infantum</i> pela técnica de IHQ em amostras medula óssea em fragmentos de osso esterno de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos, cães com infecção por <i>L. infantum</i> confirmada pela cultura parasitológica de medula óssea.....	61

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A</b>	Licença da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA/Fiocruz) – LW- 054/13 .....	<b>88</b>
<b>ANEXO B</b>	Licença da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA/Fiocruz) – LW-24/17.....	<b>89</b>
<b>ANEXO C</b>	Termo aditivo ao certificado da Licença LW-24/17 (P51-16.4) .....	<b>90</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CB - *Cell-block*

CBMO - *Cell-block* de medula óssea

CDC- Centros de Controle e Prevenção de Doenças/ *Centers for disease control and prevention*

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CP - Cultura parasitológica

cPCR - Reação em cadeia da polimerase convencional

DAT – Teste de aglutinação direta/ *Direct Agglutination Test*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPP® - Imunocromatografia de Duplo Percurso/ *Dual-path platform chromatographic immunoassay*

EEML - Eletroforese de enzimas *multilocus*

ELISA - Teste de Ensaio Imunoenzimático/ *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

FAST – Teste de aglutinação rápida/ *Fast Agglutination Screening Test*

Fiocruz- Fundação Oswaldo Cruz

HE - Hematoxilina-eosina

HP- Histopatologia

IC - Intervalo de confiança

ICQ- Imuno-citoquímica

IHQ - Imuno-histoquímica

IHQCB - Imuno-histoquímica de *Cell-block*

IHQOE - Imuno-histoquímica de osso esterno

INI - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

ISH - Hibridização *in situ*

kg - Quilograma

LAMP - Amplificação isotérmica mediada por alça

Lapclin-Dermzoo – Laboratório de pesquisas clínicas em dermatozoonoses

LTA- Leishmaniose tegumentar americana

LV - Leishmaniose visceral

LVC - Leishmaniose visceral canina

LVZ - Leishmaniose visceral zoonótica

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mm – Milímetro

MO- Medula óssea

MS - Ministério da Saúde

NNN - Novy-MacNeal-Nicolle

pH - Potencial hidrogeniônico

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

RNA - Ácido ribonucleico

TBS - Tris-Buffered-Saline

WHO - Organização Mundial de Saúde / *World Health Organization*

% - Percentagem

°C - Grau Celsius

µm - Micrômetro

® - Marca registrada

™ - *Trademark*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL ZOONÓTICA</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2 AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO</b> .....	<b>15</b>
1.2.1 <b>Reservatório doméstico da LVZ</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3 EPIDEMIOLOGIA</b> .....	<b>20</b>
<b>1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LVZ EM CÃES</b> .....	<b>24</b>
<b>1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LVZ EM CÃES</b> .....	<b>25</b>
1.5.1 <b>Importância do diagnóstico laboratorial</b> .....	<b>25</b>
1.5.2 <b>Testes sorológicos</b> .....	<b>26</b>
1.5.2.1 <u>Reação da Imunofluorescência Indireta (RIFI)</u> .....	<b>26</b>
1.5.2.2 <u>Direct Agglutination test (DAT) e Fast Agglutination Screening Test (FAST)</u> ....	<b>27</b>
1.5.2.3 <u>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</u> .....	<b>27</b>
1.5.2.4 <u>Dual-path platform chromatographic immunoassay (DPP®)</u> .....	<b>28</b>
1.5.3 <b>Testes parasitológicos</b> .....	<b>30</b>
1.5.3.1 <u>Citopatológico (exame direto)</u> .....	<b>30</b>
1.5.3.2 <u>Cultura parasitológica (CP)</u> .....	<b>31</b>
1.5.3.3 <u>Histopatológico (HP)</u> .....	<b>32</b>
1.5.3.4 <u>Imuno-histoquímica (IHQ)</u> .....	<b>33</b>
1.5.3.5 <u>Hibridização <i>in situ</i> (ISH)</u> .....	<b>35</b>
1.5.4 <b>Testes moleculares</b> .....	<b>36</b>
1.5.4.1 <u>Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP)</u> .....	<b>37</b>
1.5.5 <b>Cell-block ou citobloco</b> .....	<b>40</b>
1.5.6 <b>Sensibilidades das diferentes técnicas de diagnóstico na medula óssea para detecção de <i>L. infantum</i></b> .....	<b>41</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>44</b>
<b>3 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>46</b>
<b>3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>46</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1 AMOSTRA</b> .....	<b>47</b>
4.1.1 <b>Critérios de inclusão</b> .....	<b>47</b>
4.1.2 <b>Critérios de exclusão</b> .....	<b>47</b>

<b>4.2 EXAME CLÍNICO, NECROPSIA E COLETA DE AMOSTRAS .....</b>	<b>47</b>
<b>4.3 CULTURA PARASITOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA.....</b>	<b>49</b>
<b>4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA.....</b>	<b>50</b>
4.4.1 <b>Clivagem do <i>cell-block</i> de aspirados de medula óssea .....</b>	<b>50</b>
4.4.2 <b>Clivagem dos fragmentos de osso esterno contendo medula óssea.....</b>	<b>52</b>
4.4.3 <b>Processamento dos cortes histológicos pela imuno-histoquímica .....</b>	<b>53</b>
<b>4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>55</b>
<b>5 ASPECTOS ÉTICOS .....</b>	<b>56</b>
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>8 CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>70</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL ZONÓTICA

A leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) é causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (sin. *L. chagasi*), acometendo principalmente cães e humanos. Os cães constituem o único reservatório doméstico da infecção confirmado, geralmente apresentando uma evolução crônica, com acometimento sistêmico (MAIA; CAMPINO, 2011).

Segundo Werneck (2014), embora grande parte dos casos de leishmaniose visceral no país sejam subnotificados, o Brasil é responsável por cerca de 90% dos casos da América Latina, constituindo um grave problema de saúde pública.

No Brasil, de acordo com dados atualizados em 2019 pelo DATASUS, na região Centro-Oeste foram 18 casos humanos confirmados em Mato Grosso e 129 em Mato Grosso do Sul. Na região Norte, o Pará apresentou 542 casos confirmados, enquanto na região Sul, o estado do Rio Grande do Sul notificou 6 casos. Na região Sudeste, apenas o estado do Rio de Janeiro no ano de 2017 contabilizou 14 casos de LVZ confirmados, sendo 3 destes em Barra Mansa. Esses dados demonstram que, apesar das tentativas de contenção da doença no país, ela ainda pode ser observada nas diferentes regiões brasileiras.

## 1.2 AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO

O agente envolvido na leishmaniose visceral zoonótica é o protozoário do Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, Gênero *Leishmania*, Subgênero *Leishmania*, Espécie *Leishmania infantum*. Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas que possuem duas formas evolutivas básicas: promastigotas e amastigotas. As formas promastigotas, presentes no trato digestivo dos insetos, são alongadas, fusiformes, possuem um flagelo livre, móvel, extracelular. As formas amastigotas estão presentes no interior de células do sistema fagocítico mononuclear de várias espécies de mamíferos, são arredondadas ou ovais, com flagelo rudimentar, imóvel e intracelular, com cinetoplasto visível em forma de bastão. Ambas as formas se reproduzem por divisão binária, em hospedeiros vertebrados (amastigotas) e invertebrados (promastigotas) (MENDONÇA, 2017).

Para entender o ciclo biológico da LVZ é necessário atentar para alguns aspectos que o influenciam, como formas de transmissão, principais reservatórios e espécies envolvidas. A forma de transmissão mais comum de *L. infantum* para humanos, cães e outros hospedeiros

mamíferos (hospedeiros vertebrados) é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phebotominae, conhecidos como flebotomíneos (hospedeiros invertebrados). Entretanto, existem relatos na literatura sobre transmissão na ausência do vetor, como a transmissão vertical, venérea e por transfusão sanguínea (SOLANO-GALEGO et al., 2011).

O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor biológico (hospedeiro invertebrado) do protozoário *L. infantum* no Brasil e sua distribuição geográfica é ampla e parece estar em expansão. Esta espécie é encontrada em todas as 5 regiões geográficas. Nas regiões Norte e Nordeste, *Lu. longipalpis* era encontrado originalmente nas matas participando do ciclo primário de transmissão da doença. Progressivamente, houve adaptação desse inseto para o ambiente rural e sua adaptação foi somada à presença de animais silvestres e sinantrópicos (BRASIL, 2014).

O ciclo de transmissão vem se desenvolvendo em centros urbanos. Após o primeiro registro de epidemia urbana na década de 80 em Teresina, Piauí, o processo de urbanização da doença se intensificou, ocorrendo importantes epidemias em São Luís, Natal e Aracaju, no Nordeste; em Boa Vista e Santarém, no Norte; em Belo Horizonte e Montes Claros, no Sudeste, e em Cuiabá e Campo Grande, na região Centro-Oeste do país (GONTIJO; MELO., 2004).

Na região Centro-Oeste, outra espécie de vetor envolvida é *Lutzomyia cruzi*. Missawa et al. (2011) relataram a ocorrência de casos humanos e a presença de *Lu. cruzi* e de cães positivos, bem como a ausência de *Lu. longipalpis* em Jaciara-MT. Desta forma, a detecção de infecção natural por *L. infantum* evidenciou a participação de *Lu. cruzi* na transmissão da LVZ nesse município. Já nas intervenções de prevenção e controle da leishmaniose na região sul, identificou-se *L. infantum* pela técnica de PCR-multiplex em *Pintomyia fischeri* e *Migonemya migonei*, principais espécies de flebotomíneos capturadas (MAHMUD et al., 2019).

A espécie *Lu. longipalpis* adapta-se facilmente na fase adulta ao peridomicílio e a variadas temperaturas, podendo ser encontrada no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos (BRASIL, 2014). Porém, na fase larvária desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos, ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa. Por isso, ambientes arborizados, galinheiros, chiqueiros e canis são locais favoráveis à proliferação do vetor. Neste sentido, há indício de que um aumento da densidade populacional do inseto logo após a estação chuvosa implique uma maior transmissão da LVZ (KUHN et al., 2005; MENDES et al., 2016).

O ciclo biológico de *Lu. longipalpis* se processa no ambiente terrestre e compreende quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estádios), pupa e forma adulta. Após a cópula, as fêmeas, que são hematófagas obrigatórias, colocam seus ovos sobre um substrato

úmido no solo e com alto teor de matéria orgânica, para garantir a alimentação das larvas. Os ovos eclodem geralmente de 7 a 10 dias após a postura. As larvas alimentam-se vorazmente e desenvolvem-se em média entre 20 a 30 dias até a fase adulta, de acordo com as condições do meio ambiente. Em condições adversas, as larvas de quarto estágio podem entrar em diapausa, que é a parada do desenvolvimento que possibilita a resistência até um período favorável ao seu crescimento. As larvas de quarto estágio transformam-se em pupas, que não se alimentam, têm respiração aérea e são mais resistentes às variações de umidade do que os ovos e as larvas. O período pupal, em condições favoráveis, tem duração em média de uma a duas semanas. O período entre o desenvolvimento do ovo até o inseto adulto é de aproximadamente 30 a 40 dias de acordo com a temperatura (BRASIL, 2014).

As fêmeas de flebotomíneos (Figura 1) apresentam uma longevidade média de 20 dias e atividade crepuscular e noturna (BRASIL, 2014).

**Figura 1:** Fêmea de flebotomíneo realizando repasto sanguíneo em pele humana.



FONTE: James Gathany/CDC

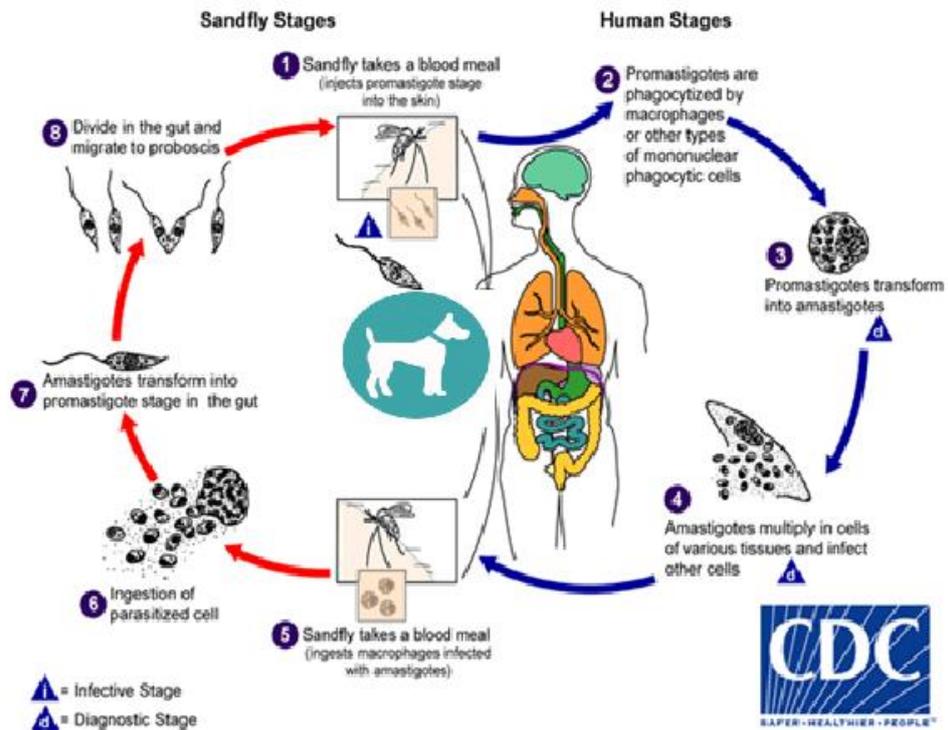
No ambiente silvestre, os reservatórios de *L. infantum* são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cercocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*), enquanto no ambiente doméstico a enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no ser humano (CAMARGO NEVES et al., 2001).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas de flebotomíneos, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania* spp. (Figura 2). No trato digestivo anterior desses flebotomíneos, ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas amastigotas, que se diferenciam em promastigotas. As formas promastigotas também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária e transformam-se em paramastigotas, as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo. Além dessa função, o movimento

do flagelo é necessário para a conclusão do ciclo de vida do parasito, sendo capaz de fornecer translocação efetiva. Se as formas promastigotas não puderem sofrer motilidade direcional, elas não poderão ser transmitidas através dos flebotomíneos, quando se diferenciam em formas infectantes denominadas promastigotas metacíclicas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas. Após este período, as fêmeas infectantes de flebotomíneos, ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a sua saliva (BENEKE et al., 2019; BRASIL, 2014).

Na epiderme do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, como macrófagos (Figura 2). Já no interior dos macrófagos, são formados os vacúolos parasitóforos, que são um tipo de compartimento intracelular revestidos por uma membrana dinâmica originada da membrana plasmática da célula hospedeira. Esses vacúolos são formados por sucessivos e coordenados eventos de fusão e fissão com vesículas da via endocítica inicial e tardia, lisossomo secundário e retículo endoplasmático. No interior dos vacúolos parasitóforos, as formas promastigotas diferenciam-se em formas amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos macrófagos. Com o rompimento dos macrófagos, há a liberação de formas amastigotas, que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (SILVA, 2014).

**Figura 2:** Ciclo biológico da leishmaniose visceral zoonótica.



FONTE: Centers for Disease Control and Prevention (CDC) – Centros de Controle e prevenção de Doenças (adaptado)

### 1.2.1 Reservatório doméstico da LVZ

O principal reservatório doméstico de *Leishmania infantum* é o cão, já que, além da alta susceptibilidade à infecção, apresenta carga parasitária significativa na pele, quando comparado aos humanos e a outros animais (ALVAR et al., 2004; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). Sobre o papel dos cães infectados que permanecem assintomáticos no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral entre cães e de cães para humanos, foi observado por Laurenti et al. (2013) que os cães sem lesões são mais competentes que os cães sintomáticos na transmissão de formas amastigotas. Segundo Molina et al. (1994), isto ocorre em função da maior taxa de repasto de flebotomíneos em cães assintomáticos. Estudos anteriores, todavia, afirmaram que cães assintomáticos e oligossintomáticos com uma menor carga parasitária apresentaram uma menor capacidade infecciosa em flebotomíneos que efetuaram repasto sanguíneo nesses animais (MICHALSKY et al., 2007; VERÇOSA et al., 2008). De qualquer forma, considerando que a maioria dos cães infectados permanece assintomática por longos períodos, é importante que os animais infectados pelo protozoário sejam detectados de forma eficiente, independentemente da medida de controle a ser utilizada nessa população

canina. Nesse sentido, um real sucesso do controle da LVC deve passar pela identificação de cães assintomáticos (BORJA et al., 2016).

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA

A LVZ possui amplo espectro epidemiológico com distribuição mundial, ocorrendo na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e nas Américas. Na América Latina, ela está presente em 12 países, sendo a maior totalidade dos casos no Brasil. Em 2018, 3.466 casos de leishmanioses foram confirmados. Em 2017, foram 4.103 confirmados dos 4.239 registrados, o que representa um aumento de 26,4% na América Latina quando comparado a 2016, bem como um aumento de 28% dos casos no Brasil. Houve ainda, na América Central, um aumento do número de novos casos em El Salvador e uma expansão geográfica da doença em Honduras. Concomitantemente, houve uma diminuição de 21% dos casos na Colômbia e de 47% no Paraguai (OMS, 2019).

Com a expansão e urbanização da LVZ no Brasil, há relatos de casos em áreas antes consideradas livres da doença (CASTRO-JÚNIOR et al., 2014; SILVA et al., 2015). Nesse contexto, vários fatores epidemiológicos podem justificar o aumento da incidência da LVZ no Brasil, a exemplo das regiões Nordeste e Sudeste. Entre estes fatores, a proximidade do convívio com o cão, considerado por muitos tutores como um membro da família; o constante processo migratório dos responsáveis pelos cães doentes com os mesmos para áreas indenes; o desmatamento acentuado com a ocupação de matas residuais e encostas nos centros urbanos e o expressivo aumento do número de vetores. Além do êxodo rural e do aumento da população urbana, as questões socioeconômicas e as condições higiênico-sanitárias da população servem de estímulo para domiciliação do vetor em ambientes que sofreram ação antrópica. Além disso, a expansão de redes de autoestradas, a popularização das viagens, o aumento do trânsito de pessoas e de seus animais de estimação, entre outros aspectos, elevaram o risco de dispersão de zoonoses incluindo a LVZ (BRASIL, 2014; SILVA et al., 2015).

É interessante mencionar ainda que espécies de mamíferos com hábitos sinantrópicos podem desempenhar um papel importante na conexão entre esses diferentes cenários ambientais, atuando como ponte para a circulação de espécies de *Leishmania* spp. entre habitats naturais e antrópicos. Desta forma, a transmissão vetorial depende de vários fatores críticos para a compreensão desta mesma dinâmica em diferentes ambientes (OSTFELD; KEESING, 2012).

Portanto, reforça-se a necessidade de estudos que documentem a ocorrência de *Leishmania* spp. em mamíferos que não sejam aqueles classificados classicamente como reservatórios (CÁSSIA PIRES et al., 2014). Seguindo esse raciocínio, embora a prevalência de infecções por *Leishmania* spp. na população equina seja baixa, pode haver um risco de seu potencial envolvimento nos ciclos de transmissão de parasitos como fonte de infecção para vetores de flebotomíneos e hospedeiros mamíferos suscetíveis no Brasil, assim como foi sugerido em um estudo na Tunísia realizado por Mhadhbi et al. (2019).

Somente no ano de 2016 foram notificados 3.200 casos dos quais 3.127 confirmados, 262 óbitos por LVZ, e uma taxa de letalidade de 7,4%. Em 2018, foram 3.466 casos confirmados de LV dos quais 289 evoluíram para óbito (SINAN, 2018).

As regiões Norte e Nordeste apresentaram uma discreta redução do número de casos em relação a 2017. Na região Norte, o estado do Pará apresentou 503 casos dos quais 42 evoluíram para óbito. Já o estado do Tocantins manteve 220 casos da doença, dos quais 15 evoluíram para óbito. Na região Nordeste, o estado do Maranhão contabilizou 653 casos de LV, o estado do Ceará 308 casos com 27 óbitos, enquanto a Bahia no mesmo ano, alcançou 238 casos com 28 óbitos humanos, isto é, 7 óbitos a mais em relação a 2017 (SINAN, 2018).

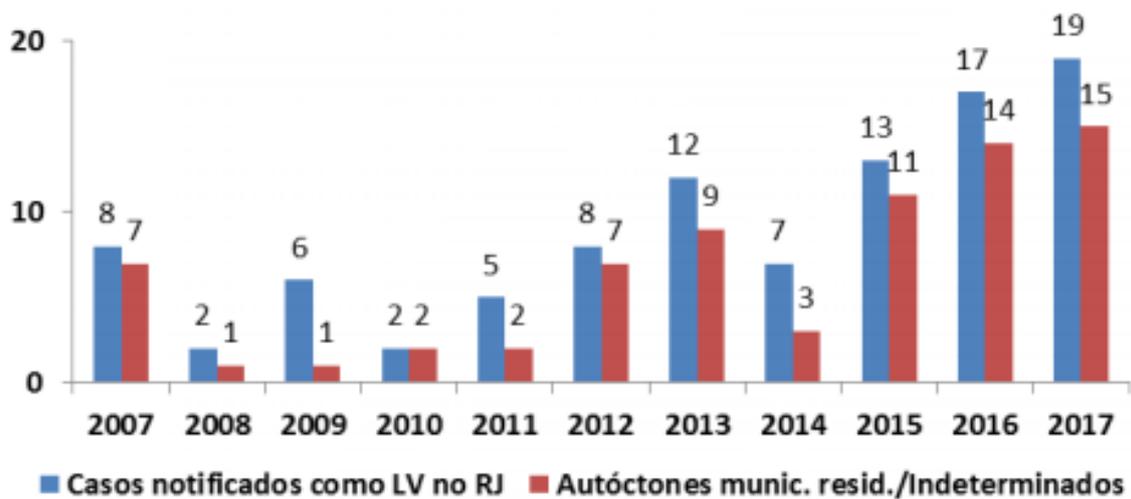
A região Sul do Brasil era considerada área indene para LV humana e canina até novembro de 2008, quando foi notificado o primeiro caso de LV canina no estado do Rio Grande do Sul, no município de São Borja, fronteira com a Argentina. No início do ano seguinte, foi notificado também o primeiro caso autóctone de LV humana no mesmo município, em um paciente de 20 anos de idade. A partir de então, novos casos humanos foram identificados e iniciou-se um surto da doença em cães no município. Até os primeiros meses de 2011 foram registrados 11 municípios com a presença de cães sorologicamente positivos para LV, sendo que cinco destas cidades fazem fronteira com o território argentino (Barra do Quaraí, Uruguaiana, Itaqui, São Borja e Porto Xavier). Segundo o Ministério da Saúde da Argentina, o primeiro caso canino da doença registrado em Santo Tomé (Corrientes), fronteira com o município brasileiro de São Borja, ocorreu em outubro de 2008, ou seja, um mês antes do registro do primeiro caso canino no município brasileiro (BRASIL, 2014). Em 2012, o estado de Santa Catarina teve seu primeiro relato de caso de LVZ realizado na cidade de Florianópolis (FIGUEIREDO et al., 2012).

Em 2017, foram notificados 8 casos de LVZ em humanos no estado do Rio Grande do Sul, reduzindo para 4 casos em 2018. Em 2017, apenas 4 casos de LV foram registrados em Santa Catarina, não tendo apresentando registro algum em 2018. Todavia, no estado do Paraná, 7 casos foram notificados em 2018, mais que o dobro quando comparamos com o ano anterior.

A região Centro-Oeste, apresentou diminuição do número de casos confirmados que totalizaram 122, com destaque para o Mato Grosso do Sul com 78 casos em 2018, 42 casos a menos em relação a 2017 (SINAN, 2018).

É importante ratificar que o número de casos notificados da LVZ na região Sudeste do país mostrou-se crescente até 2017, quando foram registrados 1.094 novos casos com 107 casos que evoluíram para óbito. Entre os anos de 2007 e 2017, 99 casos de leishmaniose visceral foram notificados no estado do Rio de Janeiro (Figura 3), sendo 72 dos casos notificados como autóctones ou indeterminados ou inconclusivos e os demais casos importados de outros estados (BRASIL, 2019). Entretanto, em 2018, a região Sudeste apresentou 428 casos confirmados e 57 óbitos. O estado do Rio de Janeiro apresentou 4 casos confirmados e 1 óbito, mostrando redução significativa em relação ao ano anterior (SINAN, 2018).

**Figura 3:** Casos notificados como LV no RJ entre 2007 e 2017.



FONTE: Ministério da Saúde - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

Silva et al. (2015) relataram a expansão de casos de cães infectados por *L. infantum* em áreas anteriormente livres da doença no estado do Rio de Janeiro. A hipótese de casos caninos de LVZ precederem casos humanos concomitantemente à presença do vetor *Lu. longipalpis* adaptado ao ambiente e a expansão geográfica dos casos caninos no Rio de Janeiro, colocou em alerta as autoridades de vigilância epidemiológica. Ao contrário do que acontece em regiões endêmicas, a introdução da LVZ em municípios considerados não afetados pode resultar em expansão súbita da doença. Isto se deve à falta de conhecimento sobre a dispersão real da mesma, à dinâmica de transmissão nessas áreas, à fauna de flebotomíneos e reservatórios silvestres e à população canina exposta ao parasito pela primeira vez (FIGUEIREDO et al., 2010; SILVA et al., 2015; SOUZA et al., 2009).

Nesse contexto, o município de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro, está localizado na latitude 22 ° 32'39 " S, longitude 44 ° 10'17 " W, altitude 381 m e tem uma área de 547.226km. A temperatura média anual é de 28° C com verões chuvosos e umidade relativa de 77%, reunindo condições de temperatura e umidade favoráveis à adaptação dos vetores flebotomíneos. Todavia, o município não apresentava relatos da doença, sendo considerado área indene até o ano de 2010 (FIGUEIREDO et al., 2010; IBGE, 2019).

Barra Mansa faz fronteira com os municípios de Valença, Quatis, Rio Claro, Piraí, Bananal, Barra do Piraí, Resende e Porto Real, formando uma conurbação com as cidades de Volta Redonda e Pinheiral e a população era de aproximadamente 184.412 habitantes em 2019 (MELLO et al., 2014; IBGE, 2019). Entre 2010 e 2012, em uma epidemia de LVZ no município de Barra Mansa, três óbitos humanos foram registrados segundo a Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro (2013). Tal fato reflete a fragilidade do controle da doença e o risco da sua expansão pelo estado.

#### 1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LVZ EM CÃES

Cães infectados podem apresentar diferentes manifestações clínicas em consequência da resposta imunológica e da interação do parasito com o hospedeiro. Os sinais da doença aparecem, em média, após 3 a 7 meses da inoculação do agente (SOLANO-GALEGO et al., 2011; BRASIL, 2014). Os cães, em quase sua totalidade, desenvolvem doença visceral ou sistêmica, sendo que 90% dos animais também apresentam algum envolvimento cutâneo (PALTRINIERI et al., 2016).

De acordo com o LeishVet, um importante grupo de estudo sobre leishmaniose visceral, entre os sinais cutâneos mais comuns em cães estão a descamação furfurácea ou dermatite esfoliativa sem prurido, que pode cursar ou não com alopecia, dermatite ulcerativa, hiperqueratose, pelagem seca e quebradiça, nódulos, pápulas, pústulas e onicogribose (Figura 4). Os sinais viscerais mais comuns relatados são hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, emaciação e sinais possíveis de insuficiência renal (poliúria, polidipsia, vômito). Quando presentes, as alterações oculares podem se manifestar como blefarite, conjuntivite, ceratoconjuntivite, uveíte e endoftalmite. Outras manifestações clínicas menos comuns são as lesões ulcerativas ou nodulares mucocutâneas e nas mucosas oral, genital e nasal, assim como epistaxe, claudicação, miosite artrófica dos músculos mastigadores, vasculopatias e alterações neurológicas (SOLANO-GALEGO et al., 2018)

Contudo, estima-se que no Brasil, entre 40-60% dos cães soropositivos sejam assintomáticos e, portanto, não identificados, o que dificulta o controle dessa zoonose (BRASIL, 2014). Animais assintomáticos são considerados tão competentes quanto os sintomáticos na infecção de flebotomíneos e podem transmitir *L. infantum* a outros caninos e humanos (COURA-VITAL et al., 2013). Em cães oligossintomáticos, os sinais clínicos identificados são poucos e inespecíficos, muitas vezes, dificultando a suspeita clínica (COURA-VITAL et al., 2013).

De maneira geral, de acordo com Solano-Galego et al. (2018), os estágios clínicos em cães são divididos didaticamente em: doença leve (estágio 1), moderada (estágio 2), grave (estágio 3) e muito grave. Na doença leve, a sorologia apresenta níveis de anticorpos negativos a fracamente positivos e os sinais clínicos em cães são discretos. Entre os sinais clínicos observamos linfadenomegalia isolada ou dermatite papular. Na doença moderada, a sorologia apresenta-se fracamente a altamente positiva e os sinais clínicos dos cães geralmente são, além dos sinais do estágio 1, lesões cutâneas difusas ou simétricas, como dermatite esfoliativa, onicogribose, ulcerações (em plano nasal, coxins plantares, proeminências ósseas e junções mucocutâneas), linfadenomegalia generalizada, anorexia e perda de peso (Figura 4).

Na doença grave, a sorologia apresenta de média a alta concentração de anticorpos e os sinais clínicos são, além daqueles apresentados nos estágios I e II, lesões por imunocomplexos (uveíte e glomerulonefrite). Na doença muito grave, a sorologia apresenta de média a alta concentração de anticorpos e os sinais clínicos são aqueles encontrados nos cães do estágio 3, assim como tromboembolismo pulmonar ou síndrome nefrótica e doença renal em estágio final.

**Figura 4:** Manifestações clínicas da LVZ em cães.



Úlceras (A), alopecia (B), descamação furfurácea (C) e onicogribose (D).

FONTE: Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos- INI

## 1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LVZ EM CÃES

### 1.5.1 Importância do diagnóstico laboratorial

Devido ao largo espectro de possíveis sinais clínicos em cães e à significativa frequência de cães sem sinais clínicos em áreas endêmicas, a LVZ necessita da utilização de exames laboratoriais para seu diagnóstico. Desta forma, animais que tenham apresentado febre intermitente, letargia, onicogribose, emaciação, hepatoesplenomegalia, alterações do apetite, anemia, linfadenopatia, descamação furfurácea, alopecia, dermatite pustular, dermatose ulcerativa, diarreia, alopecia periocular, epistaxe, uveíte, osteosinovite, artrosinovite e paresia de posteriores, entre outros sinais clínicos, devem ser investigados (SOLANO-GALEGO et al., 2011; TAFURI et al., 2004).

A investigação em animais assintomáticos ou sem sinais clínicos é tão fundamental quanto a de animais com sinais clínicos. Isto porque há importância epidemiológica no que tange à manutenção da doença devido à subnotificação da LVZ em cães assintomáticos que se mostram sorologicamente positivos (ABRANTES et al., 2016).

Diferentes metodologias de diagnóstico laboratorial são aplicadas, entretanto, nenhuma delas apresenta elevada especificidade e sensibilidade, sobretudo em cães sem sinais clínicos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; TLAMCANI, 2016).

## 1.5.2 Testes sorológicos

### 1.5.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A Reação de Imunofluorescência Indireta tem como princípio a detecção do nível de anticorpos produzidos pelo paciente testado contra um dado antígeno pesquisado, através da visualização de anticorpos fluorescentes que se ligam aos anticorpos presentes na amostra de soro do paciente que, por sua vez, foi adicionada na superfície-teste.

Desta forma, em uma segunda etapa, anticorpos marcados com fluoresceína e direcionados contra os anticorpos do paciente são adicionados à superfície-teste, de modo que se liguem aos anticorpos do paciente. A fluoresceína é um fluoróforo que produz uma marcação visível ao se utilizar microscópio de fluorescência. A intensidade da marcação é proporcional a quantidade de anticorpos presentes na amostra do paciente. Assim, amostras positivas podem ser tituladas em etapas.

O resultado da imunofluorescência indireta é normalmente expresso em diluições. O resultado considerado reagente em cães com leishmaniose é aquele que possua título igual ou superior ao ponto de corte que é a diluição de 1:40, mas o teste deve ser repetido em 30 dias para confirmação (BRASIL, 2014). Nos casos de LVC, comumente são observados títulos elevados de anticorpos no soro, geralmente superiores a 1:80, sendo que títulos inferiores necessitam de confirmação por outras metodologias. O alto número de cães soropositivos encontrado em estudos envolvendo RIFI, evidencia, entretanto, um número significativo de cães falsos-positivos em comparação com outras técnicas sorológicas (ALVES; BEVILACQUA, 2004; FIGUEIREDO et al., 2010).

A sensibilidade da RIFI, que passou a ser utilizada a partir da década de 60, varia de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soro. Devido à presença de reações cruzadas em portadores da doença de Chagas e da leishmaniose tegumentar americana (LTA), a especificidade desse teste é prejudicada. A utilização de formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) donovani* como antígeno nas RIFI aumenta sua sensibilidade, sem perder a especificidade do teste, permitindo uma maior precocidade do diagnóstico em animais assintomáticos ou oligossintomáticos (ALVES; BEVILACQUA, 2004; DE SOUZA et al., 2013). Entretanto, além da especificidade questionável, a RIFI exige na sua execução pessoal

treinado, é dispendiosa e não está adaptada para estudos epidemiológicos em larga escala (FIGUEIREDO et al., 2010; GONTIJO; MELO., 2004).

#### 1.5.2.2 Direct Agglutination Test (DAT) e Fast Agglutination Screening Test (FAST)

A aglutinação é caracterizada pela observação de agregados visíveis formados mediante interação de anticorpos específicos para LV e partículas antigênicas presentes no soro de cães testados. De fácil execução, leitura visual, baixo custo e boa reprodutibilidade, o DAT é um método de diagnóstico alternativo que pode ser utilizado em laboratórios de pequeno porte. Considera-se os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* em  $\geq 1: 320$  como correspondendo à infecção por *Leishmania* (FARAHMAND et al., 2015).

É sabido que o Teste de Aglutinação Direta (DAT) tem mostrado, em vários estudos, sensibilidade de 91 a 100% e especificidade de 72 a 100%. A técnica combina altos níveis de validade intrínseca e facilidade de execução, embora apresente problemas na padronização e controle de qualidade do antígeno e não tenha valor no prognóstico da doença. Uma variação da DAT, o *Fast Agglutination Screening Test* (FAST), vem sendo testada para aplicabilidade em situações epidêmicas e para inquéritos populacionais (GONTIJO; MELO, 2004; MELLO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2011). O FAST foi criado para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em amostras sanguíneas de cães com LV. O teste é baseado no DAT, porém combina uma concentração parasitária mais alta com um menor volume de teste. Em contraste com o DAT, o FAST utiliza somente uma diluição sorológica e os resultados podem ser lidos dentro de três horas, enquanto o DAT leva 18 a 20 horas. A técnica permite varredura rápida de grande número de amostras, o que torna o teste muito útil em levantamentos epidemiológicos de grandes populações caninas (SCHALLIG et al., 2002; DE SOUZA et al., 2013).

Schallig et al. (2002) calcularam que a sensibilidade do FAST foi de 93,6% e a especificidade foi de 89,0%. Já a sensibilidade do DAT foi de 88,6% e a especificidade de 96,7%, com ambos os testes apresentando concordância de 95,7%.

#### 1.5.2.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O teste de ELISA é bastante utilizado para o imunodiagnóstico de LV (GONTIJO; MELO, 2004). O ELISA consiste na reação de anticorpos presentes nos soros testados com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* spp. obtidos a partir de cultura *in vitro*. Esse antígeno é adsorvido em microplacas e os soros diluídos (controle do teste e das amostras) são adicionados posteriormente. Os anticorpos específicos presentes no soro vão se fixar aos antígenos. A visualização da reação ocorre quando adicionada uma anti-imunoglobulina de cão

marcada com a enzima peroxidase, que ligar-se-á aos anticorpos específicos caso estejam presentes, gerando um produto colorido que poderá ser medido por espectrofotometria. O resultado considerado reagente é aquele que apresente o valor da densidade ótica igual ou superior a três desvios-padrão do ponto de corte (Cut-Off) do resultado do controle negativo (BRASIL, 2014).

Em 2012, passou a ser utilizado preferencialmente como diagnóstico para rastreamento no Brasil, um teste imunocromatográfico rápido (DPP-LVC) baseado na proteína rK28, seguido pelo ELISA (EIE-LVC) como teste confirmatório. Entretanto, a EIE-LVC apresenta uma sensibilidade e especificidade bastante variáveis no diagnóstico de LVC, oscilando entre 72% a 97% para sensibilidade e 26% a 84% para especificidade (FRAGA et al., 2016; LIRA et al., 2006). Sabe-se ainda que o EIE-LVC apresenta baixa sensibilidade na detecção de cães assintomáticos, indicando que os atuais testes de diagnóstico de LVC precisam ser substituídos (FARIA et al., 2011; FARIA et al., 2015).

Enquanto o protocolo atual ofereceu 59% de sensibilidade, 98% de especificidade e uma precisão geral de 80%, o protocolo alterado, com ELISA usando rLci5 (uma proteína recombinante de *Leishmania* sp.) apresentou maior sensibilidade (71%), especificidade (99%) e precisão (86%). Portanto, acredita-se que um protocolo alternativo, que implementa um ELISA usando rLci5 no lugar do teste EIE-LVC, pode aumentar a sensibilidade e a precisão do protocolo de diagnóstico recomendado pelo Ministério da Saúde no Brasil, contribuindo para otimizar o diagnóstico da LVC e, conseqüentemente, melhorar o controle da LV no Brasil. Todavia, essa modificação no protocolo diagnóstico da LVC deve ser precedida de estudo multicêntrico fazendo uso de amostras representativas de diferentes regiões brasileiras, e ao mesmo tempo ratificando os resultados obtidos neste estudo (BORJA et al., 2018).

#### 1.5.2.4 Dual-path platform chromatographic immunoassay (DPP®):

A imunocromatografia significa uma alternativa aos métodos tradicionais, pois trata-se de uma tecnologia inovadora que concentra a reação antígeno-anticorpo em uma única fase sólida, sendo a mesma mantida e utilizada à temperatura ambiente. Ela utiliza uma matriz de membrana de nitrocelulose ligada a uma tira de acetato transparente. Para detectar um dado antígeno, emprega-se anticorpo de captura, ligado à matriz e anticorpo marcado com partículas coloridas que é específico para o antígeno pesquisado. Na detecção de anticorpo, utiliza-se antígeno específico ligado à matriz e anticorpo anti-imunoglobulina marcado com partículas coloridas. Para detecção de antígenos podem ser utilizados anticorpos fixados na linha de captura e como conjugado um segundo anticorpo ligado a partículas coloridas. Um dos métodos

imunológicos desses testes emprega partículas coradas, como ouro coloidal (róseo) como revelador da interação antígeno-anticorpo (CAVALCANTI et al., 2008).

O DPP<sup>®</sup> consiste em um cassete de plástico contendo duas tiras de nitrocelulose conectadas em forma de 'T' para permitir uma instalação independente para a amostra e reagente de detecção de anticorpos. O teste requer como amostra soro, plasma ou sangue total fresco e duas gotas de tampão (incluído no kit) que são adicionadas sequencialmente ao poço de amostra. A amostra diluída migra para a segunda faixa que contém uma linha de teste (K26 / K39 impressa em nitrocelulose como uma banda) e uma linha de controle. A adição de tampão para o poço conjugado libera partículas de ouro coloidais secas acopladas à proteína A / G e facilita sua migração ao longo da segunda faixa para a área de teste. As partículas de ouro então reagem a anticorpos ligados ao antígeno que estão presentes, formando um complexo imunológico colorido para visualização da banda de teste. Na ausência de anticorpos específicos, nenhuma banda é visível na janela de teste. À medida que as partículas de ouro continuam para migrar ao longo da segunda faixa, uma faixa marrom semelhante é produzida na área de controle do dispositivo, independentemente da presença de anticorpo na amostra como controle positivo, o que determina que houve bom funcionamento do teste imunorreagente (GRIMALDI et al., 2012).

Após a realização de estudo multicêntrico para avaliação de testes sorológicos, a triagem para leishmaniose visceral canina tem sido realizada com o teste imunocromatográfico Dual Path Platform (DPP<sup>®</sup>) e a confirmação por meio de ELISA (BRASIL, 2014).

Segundo Reithinger et al. (2002) e Da Costa et al. (2003), o teste DPP<sup>®</sup> LVC foi desenvolvido para a detecção conjunta de anticorpos contra os antígenos k26 e k39, e historicamente, estudos da formulação de imunoensaio cromatográfico anti-*Leishmania* canino indicaram uma sensibilidade aumentada ao usar os dois antígenos juntos, enquanto o uso de k39 ou rk39 isoladamente mostrou sensibilidades mais baixas. Embora Otranto et al. (2004) tenham atingido alta sensibilidade com o uso do antígeno rk39 isoladamente, outros estudos sugeriram que o uso combinado de diferentes antígenos está associado ao aumento da sensibilidade nos testes imunocromatográficos (FRAGA et al., 2014; GRIMALDI et al., 2012; LAURENTI et al., 2014). Souza Filho et al. (2016) demonstraram alta sensibilidade com o uso do teste Alere<sup>TM</sup> que também utiliza a quimera rK28. Uma alta sensibilidade é característica indispensável para testes de triagem e por isso este teste é empregado para o programa de controle da leishmaniose visceral (SCHUBACH et al., 2014).

Apesar de Grimaldi et al. (2012) demonstrarem 98% de sensibilidade para cães sintomáticos, enquanto em cães assintomáticos a sensibilidade foi de 47%, resultados

favoráveis também podem ser encontrados em animais assintomáticos. Em estudo recente, Larson et al. (2017) demonstraram que a maioria dos animais, sintomáticos ou assintomáticos, apresentou resultado positivo em menos de 3 minutos quando o tempo de resposta do teste DPP<sup>®</sup> LVC foi medido. Laurenti et al. (2014) detectaram infecção de animais sintomáticos e assintomáticos em proporções iguais. Todavia, é necessária cautela na avaliação de cães assintomáticos. Além disso, resultados de testes rápidos negativos devem ser avaliados com especial atenção, como sugerem Pinto et al. (2016).

Desta forma, o uso em conjunto do DPP<sup>®</sup> LVC com o ELISA pode aumentar a sensibilidade da avaliação de animais suspeitos (DA SILVA et al., 2013). Coura-Vital et al. (2014) demonstraram um aumento na detecção de LVC, em relação às medidas de prevalência e incidência, quando DPP<sup>®</sup> LVC foi utilizado em conjunto com ELISA, em oposição à técnica de RIFI usada anteriormente pelo Ministério da Saúde, o que ratifica a importância da associação destes testes de triagem atualmente.

### 1.5.3 Testes parasitológicos

O diagnóstico parasitológico tem por objetivo a visualização do parasito por meio de exame microscópico de amostras biológicas. O parasito pode ser detectado a partir de exame microscópico de amostras obtidas por raspado das lesões, por aspiração ou biópsia dos tecidos infectados, ou ainda evidenciado por *imprint* de lesão ou de órgão alvo de animais doentes de acordo com a Secretaria Municipal da Saúde do Paraná (2019).

A sensibilidade dos métodos diretos é variável e depende da experiência do analista, do tempo dedicado para a leitura da lâmina, da técnica utilizada para punção aspirativa, do processamento da amostra e da condição imunológica do paciente. Assim, diferenças quanto à sensibilidade do exame parasitológico podem ser explicadas considerando-se o grau de parasitismo, o tipo de material biológico coletado, as variáveis de processamento e coloração (LAURENTI, 2009; MAIA; CAMPINO, 2008).

#### 1.5.3.1 Citopatológico (exame direto)

A citologia aspirativa consiste em uma técnica simples, rápida, de baixo custo e pouco invasiva (FIELD; GEDDIE, 2016). O objetivo da citologia é demonstrar a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. no interior de macrófagos ou fora destes, quando a carga parasitária é elevada levando à ruptura dos mesmos (PALTRINIERI et al., 2016). A partir da punção e aspiração, é possível realizar a análise citológica da maior parte dos tecidos,

geralmente sem a obrigatoriedade da anestesia e com um mínimo de desconforto ao paciente (SCHMITT, 1997).

No exame citopatológico, uma gota do material aspirado é colocada em uma das extremidades da lâmina previamente limpa, e o material firmemente dispersado na outra direção. Após secagem, o esfregaço deverá ser fixado em álcool metílico e corado. Recomenda-se pelo menos quatro lâminas. Formas amastigotas do parasito podem ser visualizadas pelas colorações de Giemsa ou Wright, Leishman ou Panótico. O encontro de parasitos no material examinado depende do número de campos observados (200 campos devem ser examinados antes de se considerar uma lâmina como negativa) (BRASIL, 2006).

Entretanto, quando padrões citológicos como inflamação granulocítico-macrofágica ou piogranulomatosa associada à infiltração linfoplasmocitária de grau moderado a grave, em lesões cutâneas ou nodulares com hiperplasia de grau variável, sugerirem a presença da leishmaniose visceral sem visualização de amastigotas, é preciso utilizar outras ferramentas diagnósticas para concluir a positividade para a doença, já que a sensibilidade deste método costuma ser baixa (EFSA, 2015; MYLONAKIS et al., 2005).

#### 1.5.3.2 Cultura parasitológica

Métodos parasitológicos podem apresentar especificidades que chegam a 100%; entretanto, a sensibilidade é variável, uma vez que as amostras obtidas por aspirados de órgãos como pele, baço, fígado, linfonodo e medula óssea, não apresentam distribuição tecidual homogênea do parasito (GONTIJO et al., 2004; FARIA et al., 2012).

No isolamento em meio de cultura (*in vitro*), formas amastigotas do parasito são inoculadas em meios de cultura especiais, contendo ágar e sangue de coelho, passando a formas promastigotas. O clássico meio de NNN é o mais comumente empregado. A utilização de meio líquido sobre o NNN, como o meio LIT ou de Schneider, aumenta e acelera a positividade da cultura. Uma gota do material aspirado deve ser diluída em 0,5 mL de solução salina (PBS ou NaCl a 0,9%) na própria seringa. Em seguida, 0,1 mL desta solução deve ser inoculada em condições estéreis, em dois tubos de cultivo. As culturas devem ser mantidas entre 24-26°C e observadas em microscopia óptica comum ou invertida, semanalmente, até quatro semanas. Os tubos positivos devem ser encaminhados para laboratórios de referência para identificação da espécie.

A vantagem deste método é a elevada especificidade do mesmo e a sua desvantagem é a possível contaminação microbiológica, o que inviabiliza o diagnóstico (BRASIL, 2014). As culturas parasitológicas destinam-se principalmente à pesquisa e não podem ser recomendadas

para rotina prática em função do longo tempo que demandam para diagnóstico e da falta de aplicabilidade a campo (PALTRINIERI et al., 2016).

### 1.5.3.3 Histopatológico

O exame histopatológico é, em linhas gerais, uma análise microscópica de um tecido para a detecção de possíveis alterações ou lesões, com o objetivo básico de informar a natureza, a gravidade, a extensão, a evolução e a intensidade de algum problema, além de sugerir ou confirmar a sua causa, como define a Secretaria Municipal de Saúde do Paraná (2019).

A avaliação das alterações histopatológicas e parasitológicas na pele de cães com LV pode ser realizada, buscando ampliar a compreensão tanto da história natural da LVC quanto em função da importância deste sítio no contexto epidemiológico como fonte primária de infecção para os insetos vetores. A abordagem de aspectos parasitológicos na pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, portadores de diferentes formas clínicas, apontam para relação entre progressão da sintomatologia acompanhada pelo aumento do parasitismo (CARDOSO, 2013).

Verçosa et al. (2008) observaram uma correlação positiva entre carga parasitária e inflamação em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Acredita-se que a carga parasitária tenha efeito sobre o estabelecimento, bem como sobre as características e a intensidade do processo inflamatório, observando-se, portanto, maior número de células inflamatórias em cães com média e alta carga parasitária.

Assim, embora amostras de pele possam ser coletadas a campo com facilidade, apenas os animais com sinais clínicos tendem a apresentar alterações histopatológicas que levem a um diagnóstico positivo para LVC, não sendo, portanto, um exame conclusivo para animais assintomáticos. Já no baço de cães portadores de LV, as alterações são variáveis (COSTA-VAL, 2007). Os parasitos induzem uma desorganização na estrutura celular do órgão, com a hiperplasia da polpa branca e polpa vermelha, formação de granulomas e atrofia de folículos linfóides, que determinam esplenomegalia em graus variados (ALVAR et al., 2004; SANTANA et al., 2008). O aumento esplênico parece estar associado ao aumento do número das fibras reticulares, ao aumento no número de monócitos e macrófagos, assim como às alterações na estrutura da microvasculatura (SANTANA et al., 2008).

Entretanto, é impossível desconsiderar que, apesar da significativa carga parasitária encontrada no baço enquanto amostra biológica, seja em cães com sinais clínicos, seja em cães assintomáticos, a sua obtenção é muito invasiva. Assim, possíveis efeitos adversos, entre eles

hemorragia, inviabilizam a realização da coleta de amostras de baço a campo (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Nesse contexto, alterações na medula óssea, particularmente alterações displásicas, podem estar relacionadas à progressão da LVC. Mais estudos são necessários para entender se um exame da medula óssea de cães com leishmaniose pode ajudar a identificar animais infectados sem sinais clínicos que possam vir a desenvolver a doença (CARDOSO, 2013).

Desta forma, a histopatologia (HP) pode ser utilizada para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina através da detecção microscópica do parasito e caracterização de lesões teciduais decorrentes da presença do patógeno. No entanto, apesar de uma elevada especificidade, esta técnica apresenta algumas limitações. Entre estas, a variação da sua sensibilidade, dependendo do processamento histológico e do tipo de amostra fornecida, assim como a demora operacional e a dificuldade de reconhecimento do parasito, de acordo com a experiência do observador (GIUNCHETTI et al., 2006; XAVIER et al., 2006). Assim, diagnósticos etiológicos errados ou inconclusivos podem ocorrer na HP quando estão envolvidos organismos histomorfologicamente semelhantes (MENEZES et al., 2013).

#### 1.5.3.4 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica é uma técnica de diagnóstico direto que se baseia na detecção do parasito corado em fragmentos teciduais. De forma sucinta, a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) baseia-se na detecção de antígenos *in situ* por meio da utilização de um anticorpo (policlonal ou monoclonal) primário, relativamente específico, e de um sistema de enzima e substrato cromógeno que se deposita no local da reação antígeno-anticorpo. No final da década de 80, foi descrita a identificação de amastigotas de *L. donovani* em cortes histológicos de pele, fígado e baço de cães, dentre outros locais, pela incubação com soro de cães infectados, que atuaram como anticorpos primários, e posterior revelação por anticorpos secundários marcados com peroxidase. Essa técnica, desde o seu desenvolvimento, forneceu resultados consistentes no diagnóstico canino (KENNER et al., 1999).

A detecção de agentes infecciosos contribui com a compreensão da distribuição e a localização dos biomarcadores entre si e em relação ao resto do material de amostra com dados mais precisos, especialmente em situações onde os patógenos não são visualizados pela morfologia convencional. Nesse contexto, o diagnóstico imuno-histoquímico das leishmanioses, por exemplo, depende do achado de estruturas marcadas pelo anticorpo, de forma e de tamanho compatíveis com amastigotas (BETINA et al., 2005; XAVIER et al., 2006).

Para realização da IHQ, é necessária fixação prévia das amostras em formalina tamponada a 10%. Pode também ser realizada imuno-citoquímica, quando as amostras são esfregaços de células e IHQ em *cell-block*. A técnica de *cell-block* associada à imuno-histoquímica facilita a observação das formas amastigotas do aspirado celular coletado ao permitir a concentração dos macrófagos parasitados na capa leucocitária, o que facilita a leitura das lâminas para diagnóstico. (MENEZES et al., 2016) Em geral, são obtidas biópsias de pele, aspirados de linfonodo, medula óssea, baço e biópsia hepática, entre outras amostras, nas quais formas amastigotas do parasito podem ser observadas. Para o diagnóstico da LVC, os aspirados de medula e linfonodos são os mais usados pelos clínicos veterinários (SILVA et al., 2007).

As etapas da técnica de IHQ envolvem obtenção da amostra biológica, fixação, processamento, microtomia, recuperação antigênica, bloqueio de substâncias endógenas, aplicação de anticorpos e cromógenos, análise histológica, interpretação e diagnóstico. Didaticamente, essas etapas são divididas em fases. A fase pré-analítica se relaciona com a amostra em sua origem e ao processamento do material tecidual a fim de garantir a qualidade da amostra para o exame. A fixação do tecido é uma etapa crucial da técnica e visa garantir sensibilidade suficiente dos reagentes para a marcação imuno-histoquímica e análise dos resultados. Um maior ou um menor tempo de exposição da amostra ao fixador, por exemplo, pode afetar a reação antigênica. Já a fase analítica, engloba a escolha de anticorpos primários e o sistema de visualização. A recuperação antigênica pode ser obtida por diferentes métodos e uma escolha adequada depende do tempo de fixação, do tipo de fixador e da natureza do antígeno e do anticorpo. A sensibilidade da reação imunológica pode depender principalmente do método escolhido, o que torna fundamental a especialização do laboratório e a padronização dos procedimentos para que esta sensibilidade seja a maior possível. Na fase pós-analítica, é dada a correlação e a interpretação dos resultados imuno-histoquímicos com a clínica do paciente. Nessa fase, a experiência do patologista, ao escolher os reagentes e anticorpos utilizados e o respectivo método padronizado, é importantíssima para a quantificação dos resultados. O exame imuno-histoquímico é um método prático que ao ser realizado com profissionais capacitados, torna-se uma ferramenta diagnóstica poderosa (ALVES et al., 1999; BETINA et al., 2005).

Entre as vantagens da IHQ, está na maior facilidade de detecção do parasito nos tecidos, principalmente quando a carga parasitária é baixa, e é plausível de ser implantada na rotina de diagnóstico laboratorial. Ainda sobre as suas vantagens, há possibilidade de realizar estudos retrospectivos com a amostra incluída em blocos de parafina, bem como a facilidade de manipulação do material a ser submetido ao exame, visto que este ao ser colocado em fixador

adequado, pode dispensar os cuidados especiais como refrigeração (que é necessária para efetuar o isolamento em cultura). A aplicação dessa técnica facilita a busca ativa de cães, mesmo em áreas remotas, em que as amostras podem demorar a chegar ao laboratório (XAVIER et al., 2006).

Já entre as desvantagens, o resultado do exame de IHQ é influenciado por diversos fatores pré e pós-analíticos, como na etapa inicial pela qualidade de fixação do espécime, na fase intermediária pela escolha dos anticorpos e pelas reações propriamente ditas, e na etapa final na interpretação de leitura das lâminas. Além da precisão limitada, a IHQ não permite diferenciação de espécies de *Leishmania* spp. (ALVES et al., 1999; MENEZES et al., 2013).

A produção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. é uma etapa fundamental para realizar sua aplicação em técnicas imunológicas de diagnóstico. Outros autores já utilizaram soro hiperimune de coelho e de cão como anticorpo primário anti-*Leishmania* spp., que pode influenciar nos parâmetros de sensibilidade e especificidade do teste. A IHQ apresenta boa especificidade e sensibilidade de cerca de 60 a 70 %. Entretanto, quando o anticorpo secundário utilizado não é específico para a imunoglobulina canina, pode ocorrer reação cruzada, levando a falsos-positivos (TAFURI et al., 2004).

Entre os testes parasitológicos, considerando as técnicas de imuno-histoquímica (IHQ), hibridização *in situ* (ISH) e cultura parasitológica (CP) utilizadas em diferentes tecidos como pele, baço, linfonodo e medula óssea, a IHQ apresentou as maiores taxas de positividade quando comparada às demais (FURTADO et al., 2015).

Desta forma, atualmente, o Ministério da Saúde inclui a IHQ como exame de referência para o diagnóstico de casos autóctones de LVC, sendo esta técnica parte do fluxograma de ações de controle e vigilância da enfermidade (BRASIL, 2014).

#### 1.5.3.5 Hibridização *in situ*

A Hibridização *in situ* (HIS ou ISH) é uma técnica pela qual se identificam sequências específicas de nucleotídeos em células ou cortes histológicos. A hibridização, por definição, é uma reação em que uma sequência alvo desnaturada e uma sonda de fita simples de DNA ou RNA complementar formam um híbrido estável pela ação do calor (NEVES et al., 2012; SWINGER & TUCKER, 1996).

De acordo com Menezes et al. (2013), a técnica de hibridização cromogênica *in situ* (ISH) é um método promissor para o diagnóstico de LV canina, pois permite a identificação altamente específica de *Leishmania* spp. em amostras de biópsia cirúrgica de cães fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE). A sonda de oligonucleotídeos genérica, específica

para gênero *Leishmania* spp. (IHS-GP), apresentou 70,6% de sensibilidade e 85,3% de especificidade para diagnóstico de infecção por *L. infantum* em cães. Já uma sonda específica para *L. infantum* (ISH-SP), teve 74,5% de sensibilidade e especificidade de 87,2%. O uso do ISH-SP para a detecção específica de *L. infantum* será particularmente importante em áreas onde esse organismo ocorre simultaneamente com *L. braziliensis*. Isto porque nessas áreas, cães infectados apenas por *L. braziliensis*, que na sonda genérica seriam confundidos com cães que estivessem infectados por *L. infantum*, não seriam considerados envolvidos com a transmissão zoonótica. Desta forma, eutanásias desnecessárias seriam evitadas nesses animais. Entretanto, a sonda específica reagiu com espécies de *Leishmania donovani*, *L. tropica* e *L. major*, o que justifica projeto de sondas adicionais em áreas onde essas espécies são encontradas com *L. infantum* (BRASIL, 2014; MENEZES et al., 2013).

A principal vantagem da ISH sobre a CP, PCR, ensaios sorológicos, IHQ e HP para o diagnóstico de infecção por *Leishmania* em cães é que ele permite simultaneamente a visualização das formas amastigotas intactas no tecido e identificação de espécies como *L. infantum*. Ao se observar as formas amastigotas no tecido é possível correlacionar parasitos com as lesões associadas e, também, semi-quantificar a carga parasitária. Testes extensivos da especificidade da ISH não mostraram reação cruzada das sondas de *Leishmania* spp. com outros organismos histomorfologicamente semelhantes. Afinal, parasitos como *Histoplasma* spp. e *Trypanosoma* spp., são difíceis de diferenciar da *Leishmania* spp. pela HP (MENEZES et al., 2013).

#### 1.5.4 Testes Moleculares

Os testes moleculares são aqueles que por meio da utilização de marcadores complementares permitem identificar uma sequência específica de DNA ou RNA. Isso é possível através de processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA, ou ainda, efetuando localização específica de sequências de ácidos nucleicos nos cromossomos ou em tecidos. São realizados por modernas técnicas de sequenciamento, hibridização e PCR em materiais de biópsia emblocados em parafina, citologia em meio líquido, punção aspirativa por agulha fina de diferentes órgãos e sangue. Com a aplicação de testes moleculares é possível identificar alterações genéticas específicas, analisando DNA e expressão gênica, o que permite a conduta terapêutica mais adequada em cada caso. A maioria das espécies de *Leishmania* foi sequenciada, revelando uma conservação geral da ordem dos genes, estrutura cromossômica e diferenças discretas no conteúdo gênico. Esses recentes avanços na pesquisa ajudaram no

desenvolvimento de dispositivos e plataformas de diagnóstico molecular rápido mais apropriados de acordo com Akhoundi et al. (2017).

No entanto, apesar do desenvolvimento tecnológico, há uma enorme diferença no uso de um diagnóstico molecular padronizado e comercialmente disponível, em oposição aos kits *in house*. Até agora, vários métodos moleculares foram desenvolvidos para detecção, identificação, quantificação e análise filogenética de *Leishmania* spp. conforme será comentado adiante.

#### 1.5.4.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP)

Segundo Schönian et al. (2011), a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) tem aplicações na quantificação dos parasitos e, portanto, também no monitoramento da progressão da doença, prevendo e controlando o resultado de possível terapia anti-leishmanial. Além do diagnóstico em si, realizando a discriminação de espécies, a qPCR ajuda a definir características específicas do parasito, como virulência ou resistência a medicamentos. Já o método convencional de PCR (cPCR) tem algumas limitações, mostrando apenas presença ou ausência de *Leishmania* sem quantificação da carga parasitária.

Diferentes tipos de amostras biológicas podem ser utilizados como fonte de material para as reações, tais como aspirados esplênicos, de medula óssea, de linfonodos, sangue total, camada leucocitária, cultura, sangue coletado em papel-filtro e tecidos coletados por biópsia ou necropsia (GONTIJO; MELO, 2004).

Entre as técnicas moleculares, a qPCR agora é considerada o método diagnóstico mais confiável devido a sua maior sensibilidade (TRAVI et al., 2018). A maioria das espécies de *Leishmania* de importância médica são facilmente distinguidas por sequenciamento de DNA ou análise enzimática de restrição do produto de PCR. O polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição ITS1 PCR (RFLP) é usado para identificação direta de espécies em tecidos de pacientes, sangue ou outras amostras sem cultura prévia de parasitos, análise microscópica ou outra técnica (TOZ et al., 2009; TOZ et al., 2013). Avaliações da medula óssea mostram que qPCR (TaqMan) detectou 0,2 parasitos/mL, enquanto a PCR convencional baseada em kDNA (cPCR) resultou positiva somente quando as amostras continham mais de 30 parasitos/mL. Adicionalmente, a fonte da amostra tem uma influência significativa na capacidade dos testes para identificar cães infectados. Amostras de medula óssea e linfonodo produzem o maior número de resultados positivos em comparação com outros locais, independentemente do estado clínico (TRAVI et al., 2018).

No entanto, a qPCR não mede diretamente o número de parasitos viáveis que circulam no sangue, mas a quantidade de DNA do parasito em circulação. Portanto, a sensibilidade do qPCR depende do design do ensaio (região primer e alvo), da química utilizada (SYBER Green ou TaqMan) e da natureza das amostras clínicas (sangue, pele), entre outros aspectos. Usando esta técnica, foi demonstrado anteriormente que a avaliação quantitativa simultânea do DNA e citocina de *Leishmania* pelo ensaio de qPCR permite prever o desenvolvimento da doença em cães infectados assintomáticos (MANNA et al., 2006).

Entre 2011 e 2013, os protocolos de PCR convencional para LV canina apresentaram uma variação de sensibilidade de 72,2 a 98,7% para cães, e a especificidade variou de 83,3 a 96,4% para cães. Nas reações em cadeia da polimerase convencional (cPCR) utilizam-se os primers específicos do citocromo B dos mamíferos como gene constitutivo, para garantir a qualidade das amostras. Resultados obtidos mostram o cPCR como sendo mais sensível que o qPCR em amostras de cães. Isso reforça que algumas características como a região alvo do DNA, bem como o par de primers utilizados, podem ser determinantes (JUNIOR et al., 2013; MOHAMMADIHA et al., 2013; SOLCÀ et al., 2012; WANG et al., 2011; YANG et al., 2013).

Como ocorre em diferentes estados clínicos, a carga parasitária nas várias amostras é diferente. Reações de qPCR foram padronizadas para detectar o DNA do parasito de esfregaços de aspirados de medula óssea corados por Giemsa. Foi detectado DNA de *L. chagasi* em 100% das amostras caninas (DA SILVA et al., 2010).

É importante mencionar que a qPCR pode ser realizada periodicamente em amostras de medula óssea canina após infecção experimental por *L. infantum*. O DNA de *L. infantum*, detectado e quantificado por qPCR a partir do segundo mês de infecção, aumenta gradativamente ao longo do tempo. Assim, a qPCR detecta LVC em momentos anteriores em comparação com a cPCR ITS-1 devido à sua maior sensibilidade (RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007).

Apesar dessas vantagens, vários inibidores da *Taq* Polimerase são encontrados nessas amostras clínicas ou são comumente usados para coleta de amostras e extração de DNA, como EDTA, proteinase K, fenol e altas concentrações de sais (GONÇALVES et al., 2012; YANG et al., 2004).

Seguindo essa lógica, alguns autores trouxeram a estratégia da PCR multiplex para incluir controles endógenos em conjunto com o sistema de detecção de *Leishmania* spp. na mesma reação, para os ensaios cPCR e qPCR (GONÇALVES et al., 2012; ANDREADOU et al., 2012). Mohammadiha et al. (2013) realizaram esse formato multiplex para humanos e cães,

usando qPCR baseado em TaqMan, atingindo uma sensibilidade muito boa em ambos os casos (93,9 a 100%, respectivamente).

Entretanto, como desvantagem, a realização das diferentes técnicas de PCR possui a necessidade de laboratórios bem equipados. Além disso, não é tão econômico quanto outros métodos diagnósticos, o que é uma preocupação nos países em desenvolvimento (EJAZI & ALI, 2013; SRIVIDYA et al., 2012).

Abordagens moleculares inovadoras, como o Ensaio Baseado em Sequência de Ácidos Nucleicos (NASBA), a Amplificação Isotérmica Mediada por Alça (LAMP) e o Oligo-Test de baixa tecnologia têm sido cada vez mais aplicados para a detecção de DNA ou RNA de *Leishmania*. O LAMP, uma promissora ferramenta de diagnóstico, foi adotado como uma técnica alternativa à PCR, por ser uma tecnologia mais rápida, sensível e de menor custo, que utiliza a turbidez da amostra como critério de positividade. Não é necessário um termociclador, apenas “banho-maria” ou “banho seco”, pois a reação é isotérmica. Portanto, esta é uma ferramenta adequada para aplicação em campo (KHAN et al., 2012; THEKISOE et al., 2009).

Verma et al. (2013) desenvolveram um ensaio baseado em LAMP para detecção de *L. donovani* em humanos com LV e leishmaniose dérmica pós-cala-azar (PKDL), em que as taxas de sensibilidade e especificidade foram boas para ambos os casos, atingindo 96,4-98,5% (em amostras de sangue); 96,8-98,5% (biópsia de pele). No entanto, Chaouch et al. (2013), ao desenvolverem um ensaio de LAMP para detecção de *L. infantum* em amostras de sangue de cães, usando como padrão de referência cPCR, RIFI e citologia, alcançaram sensibilidade inferior (54,2%), apesar de a técnica ter apresentado um desempenho melhor que cPCR, estatisticamente. O alvo escolhido (gene da cisteína Protease B - *cpb*) e a não utilização de um controle interno de qualidade podem explicar em parte esse resultado.

Gao et al. (2015) mostraram que o ensaio LAMP não invasivo, baseado em *swab*, foi mais sensível na detecção de leishmaniose em cães do que cPCR, ELISA e microscopia. Os resultados mostraram que LAMP é um método sensível e específico para cães domésticos, útil para vigilância epidemiológica, com utilização a campo, particularmente de caninos assintomáticos, em áreas endêmicas de LVZ no oeste da China. As frequências de positividade para *L. infantum* obtidas para as amostras coletadas a campo foram de 61,3% para LAMP, 58,6% para cPCR, 40,5% para ELISA e 10,8% para microscopia. Foi observada uma especificidade de 97% para cPCR e LAMP.

### 1.5.5 *Cell block* ou citobloco

*Cell-block*, citobloco ou citoinclusão é uma técnica que permite a concentração de células provenientes de amostras líquidas ou reaproveitamento de material coagulado evitando a dispersão celular (PAIVA et al., 2014). A combinação da citologia aspirativa e citobloco de medula óssea é considerada vantajosa já que permite estudar simultaneamente a citomorfologia e o arranjo celular na ausência de biopsia tecidual (UNIYA et al., 2016). A inclusão em parafina otimiza as amostras citológicas e a confecção de várias lâminas histológicas (ABRANTES et al., 2016; FERNANDES et al., 2015). Essa técnica consiste na concentração de células por centrifugação ou filtração e, através do processamento de amostras teciduais, é possível que sejam realizadas avaliações histopatológicas e imuno-histoquímicas em função da preservação da morfologia celular (NATHAN et al., 2000). A técnica foi inicialmente descrita por Bahrenburg (1896) e, a princípio, aplicada para análise de fluídos pleurais e peritoneais, lavagens brônquicas e aproveitamento de amostras líquidas obtidas por meio de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) (ÇAKIR et al., 2014; ZANONI et al., 2012). A partir de então, vem sendo empregada para a investigação de diferentes enfermidades (COLLINS et al., 2012; KASE et al., 2016; UNIYA et al., 2016).

A utilização da técnica *cell-block* para detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. no tecido medular é reconhecida como importante alternativa no aproveitamento de material aspirado da medula óssea, mesmo em amostras consideradas inadequadas para as análises de rotina. A técnica possibilita a aplicação de diferentes colorações e marcadores imunológicos no tecido (ABRANTES et al., 2016; MENEZES et al., 2016).

Uma das primeiras aplicações da técnica *cell-block* utilizando amostra de medula óssea foi realizada por Dee et al. (1976), que confirmaram a sua eficácia na identificação do envolvimento desse tecido em pacientes humanos com linfoma quando comparado ao exame de fragmentos de biópsia, tradicionalmente utilizado. Pesquisadores também reconheceram a eficácia do uso desta técnica na investigação de neoplasias hematopoiéticas, metástases, tuberculose extrapulmonar e invasão por agentes nematoides no tecido medular (SANTOSH et al., 2015, 2016; UNIYA et al. 2012). Na LV, o emprego do citobloco para o diagnóstico ainda é escasso. Em medicina veterinária a técnica de *cell-block* vem sendo utilizada em alguns estudos. Abrantes et al. (2016) e Menezes et al. (2016) confirmaram um aumento na positividade para formas amastigotas de *Leishmania* spp. do exame quando a citoinclusão foi comparada com os outros métodos parasitológicos empregados.

Paiva et al. (2014) testaram protocolos para confecção de citoblocos em amostras provenientes de capa leucocitária e de medula óssea de cães e autenticaram o baixo custo e a

reprodutividade do método como complemento ao diagnóstico. A associação do citobloco e IHQ demonstrou ser útil para a identificação de micrometástases medular de carcinoma em cães e gatos, entretanto os autores alertaram a necessidade de novas avaliações com maior número de pacientes (TAYLOR et al., 2013). Ong et al. (2015) destacaram a importância do reaproveitamento de material por meio da utilização da citoinclusão, especialmente diante de fragmento e aspirado do tecido medular considerados inadequados para análise. Os autores também salientaram a possibilidade do uso da técnica associada a outros métodos diagnósticos complementares.

Acredita-se que a formação de uma camada de leucócitos parasitados com as amastigotas após a centrifugação facilita a observação do agente. Destaca-se, entretanto, que em alguns trabalhos os pesquisadores associaram CB à técnica de IHQ, raramente utilizada na rotina clínica, obtendo bons resultados, e admitiram a necessidade de novas investigações para validação do método (MENEZES et al., 2016). A possibilidade de associação com a técnica de IHQ também é reconhecida como uma das vantagens da utilização das amostras processadas para histopatologia, principalmente diante de hipocelularidade do material a ser avaliado. Essa combinação pode aumentar a precisão do diagnóstico (GOYAL et al., 2014).

Taylor et al. (2013) também admitiram um incremento na capacidade de detecção de micrometástase em medula óssea de cães utilizando o citobloco associado a IHQ, quando comparado ao esfregaço direto obtido por citologia aspirativa.

Desta forma, até o momento, a aplicação da técnica tem demonstrado melhorar a sensibilidade do exame parasitológico quando associada à marcação da IHQ (ABRANTES et al., 2016; ANTUNES et al., 2018). A utilização do citobloco na concentração de células medulares para a busca de formas amastigotas de *Leishmania* é recente e merece mais investigações.

#### **1.5.6 Sensibilidades das diferentes técnicas de diagnóstico na medula óssea para detecção de *L. infantum***

Sítios de coleta da medula óssea em cães incluem a crista ilíaca dorsal, a fossa intertrocanterica femoral, o tuberculo maior do úmero, o osso esterno e as costelas através da junção costo-condral. Em cães de médio e grande porte, a crista ilíaca é um local de predileção para a coleta, enquanto em cães de pequeno porte, o fêmur ou o úmero podem ser usados. Todavia, coletas realizadas em ossos longos são passíveis de fraturas após a introdução da agulha de grosso calibre, em função do movimento de alavanca (LARUE et al., 2005; MULLER et al., 2009). Nesse contexto, Defarges et al. (2013) demonstraram que a celularidade dos

aspirados medulares são semelhantes para todos os sítios de coleta ao compararmos esterno, úmero e ílio.

Paparcone et al. (2013) demonstraram em um grande número de cães que a aspiração esternal da medula óssea pode ser realizada sem anestesia, o que torna o método econômico e sem maiores riscos à saúde do cão. Em relação ao risco de lesões cardíacas ou pulmonares, 889 cães submetidos a cerca de 2.500 aspirações de medula óssea não apresentaram problemas. Além disso, Grynepas et al. (1992) afirmaram que a aspiração realizada na região esternal é menos dolorosa que na região ilíaca. Portanto, o aspirado de medula óssea esternal pode ser considerado um método seguro e fácil capaz de fornecer uma boa amostra representativa de tecido para diagnóstico parasitológico de LVC e avaliação de celularidade hematopoiética do paciente (PAPARCONE et al., 2013).

Na Tabela 1, foram relacionados alguns estudos que avaliaram as frequências de positividade para *Leishmania* spp. relacionadas à sensibilidade de diferentes técnicas de diagnóstico parasitológico e molecular em amostras de medula óssea e seus padrões de referência utilizados.

**Tabela 1:** Técnicas de diagnóstico parasitológicas e moleculares utilizadas para detecção de *L. infantum* em cães e suas frequências de positividade nas amostras de medula óssea, com respectivo padrão de referência.

Sítio de coleta	Técnica	No. de amostras	Frequência positividade (%)	Padrão de referência	Autores
Esterno	IHQ	65	42 (64,6%)	Sorologia	Furtado et al. (2015)
	CP	65	35 (53,8%)		
	ISH	65	38 (58,5%)		
Esterno	IHQCB	45	14 (31,1%)	Sorologia	Menezes et al. (2016)
	CP	45	6 (13,3%)		
	HP	45	4 (8,9%)		
Esterno	IHQ	89	43 (48,3%)	Sorologia	Moreira et al. (2007)
	HP (HE)	89	19 (21,3%)		
Esterno	Citologia (biópsia)	24	15 (62,5%)	Sorologia	Ramos et al. (2013)
	qPCR	24	24 (100%)		
Esterno	CP	121	80 (56,7%)	Sorologia	Mello et al. (2014)
Esterno	Citologia	14	8 (57,1%)	Sorologia	Toplu e Aydogan (2011)
Esterno	IHQ	22	20 (90,9%)	Sorologia	Ramos et al. (2012)
	HP	22	10 (45,4%)		
	cPCR	35	9 (25,7%)		
	qPCR	35	34 (97,1%)		
Esterno	Citopatologia	50	37,5%	CP	Vasconcellos et al. (2016)
	ICQ	50	0%		
Úmero	CBMO	26	24 (92,3%)	CP e PCR	Antunes et al. (2018)
	Biópsia	26	24 (92,3%)		
	Citologia	26	25(96,1%)		
Esterno	Citocentrifugação	92	47,1%	CP	Mello et al. (2016)
	Citologia (fina)	92	52,8%		
	Citologia (espessa)	92	77%		
Esterno	Citopatologia	41	39(95,1%)	Sorologia	Honse (2014)

Legenda: IHQ- Imuno-histoquímica; ISH- Hibridização in situ; IHQCB- IHQ usando *cell-block*; HP- Histopatologia; HE- Hematoxilina-eosina; qPCR- Reação em cadeia da polimerase em tempo real; cPCR- PCR convencional; CP- Cultura parasitológica; ICQ- Imunocitoquímica; CBMO- *Cell-block* de medula óssea

## 2 JUSTIFICATIVA

Barra Mansa é um município da região sul do estado do Rio de Janeiro, onde nove casos humanos de LVZ foram relatados entre 2010 e 2013 (PIMENTEL et al., 2014). A confirmação desses casos desencadeou uma série de ações em Barra Mansa para o rastreamento da ocorrência e extensão da LV entre cães domésticos. Nesse período, foi relatada uma prevalência em cães de 4,5% (MELLO et al., 2014).

Embora vários pesquisadores investiguem diferentes métodos de diagnóstico, até o momento, não foram desenvolvidos testes que apresentem 100% de especificidade e sensibilidade para o diagnóstico da LVZ em cães (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; TLAMCANI, 2016). Portanto, a investigação de novos métodos de diagnóstico e a associação de diferentes técnicas é imprescindível para que seja possível melhorar a eficácia da detecção do parasito.

Especialmente nos casos de LVZ, a avaliação microscópica dos esfregaços diretos confeccionados a partir da aspiração de medula óssea é considerada de grande utilidade para diagnóstico, auxiliando no monitoramento do tratamento, além de ser um sítio de coleta que oferece menores riscos de hemorragia se comparado à punção de baço (COTTERELL et al., 2000; GEORGIADOU et al., 2015; MILLER; BAIN, 2015).

De forma geral, métodos parasitológicos apresentam alta especificidade, entretanto sua sensibilidade é variável, uma vez que depende da intensidade parasitária no tecido medular e do número de campos observados ao microscópio (BRASIL, 2014; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Diante destas considerações, métodos parasitológicos que utilizam aspirados de medula óssea como amostra apresentam alta frequência de positividade, o procedimento é pouco invasivo, sem necessidade de anestesia geral, possibilitando um diagnóstico confiável de leishmaniose de acordo com Paparcone et al. (2013). A predileção desse parasito pelo sistema fagocítico mononuclear, a persistência e o rápido acúmulo de amastigotas na medula óssea fazem com que a busca do agente, nesse tecido seja considerada um dos meios mais sensíveis para a confirmação da leishmaniose (NICOLATO et al., 2013).

A associação de técnicas que promovam a concentração celular, a realização de cultura e a aplicação de imunocitoquímica no esfregaço direto pode ser recomendada para aumentar a sensibilidade e, assim, melhorar a capacidade diagnóstica da leishmaniose visceral em aspirados de medula ou de outros órgãos (MILLER; BAIN, 2015; GUERRA et al., 2019; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Na medicina veterinária, a citologia aspirativa dos linfonodos periféricos é, preferencialmente, utilizada na investigação parasitológica da LV canina. Contudo, alguns autores atribuíram menor sensibilidade a este tecido, principalmente, em cães assintomáticos ou em fase inicial de infecção, devido ao baixo parasitismo e dificuldade de colheita na ausência de hiperplasia linfoide (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). É válido lembrar que a presença de animais assintomáticos e a diversidade de manifestações clínicas dificultam o diagnóstico e o controle dessa protozoonose, o que traz a necessidade da busca por novas ferramentas de detecção do parasita (BRASIL, 2014; GONTIJO; MELO, 2004; DA SILVA et al., 2006).

A técnica de IHQ empregada em *cell-block* de aspirados de medula óssea apresenta-se como uma alternativa para o diagnóstico parasitológico da infecção por *Leishmania* spp. (MENEZES et al., 2016; ABRANTES et al., 2016). Isso porque a IHQ usando *cell-block* de medula óssea mostrou os melhores resultados na detecção de *Leishmania* em relação aos resultados obtidos na HP e na CP (ABRANTES et al., 2016; MENEZES et al., 2016). Além disso, essa técnica apresentou maior positividade que testes sorológicos como RIFI, ELISA e DPP® (ABRANTES et al., 2016). Outras vantagens dessa técnica são a coleta de amostras a campo, como descrito por Abrantes et al. (2016), menor probabilidade de contaminação de amostras e a manutenção da morfologia celular, possuindo potencial uso como técnica de referência para confirmação de diagnóstico e validação de técnicas sorológicas. Entretanto, ainda não foram realizados estudos da avaliação da sensibilidade da técnica de IHQ usando *cell-block* em aspirado de medula óssea para a detecção de *Leishmania* spp. em cães.

### 3 OBJETIVO GERAL

Avaliação da sensibilidade da técnica de imuno-histoquímica usando *cell-block* de aspirados de medula óssea para a detecção de *Leishmania* spp. em cães naturalmente infectados, usando como padrão de referência a técnica de cultura parasitológica.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Comparar a sensibilidade da técnica de imuno-histoquímica usando *cell-block* de aspirados de medula óssea com a sensibilidade da técnica de imuno-histoquímica em amostras de medula óssea de fragmento do osso esterno, considerando a cultura parasitológica de medula óssea (MO) como padrão de referência em cães com ou sem sinais clínicos
- ✓ Comparar a sensibilidade da técnica de IHQ usando *cell-block* de aspirado de medula óssea com a sensibilidade da técnica de IHQ de amostras de medula óssea de fragmentos de osso esterno, considerando a cultura parasitológica de MO, baço, pele ou linfonodo como padrão de referência em cães com ou sem sinais clínicos

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRA

Foi estudada uma amostra de conveniência de 84 cães infectados naturalmente por *L. infantum*, provenientes do município de Barra Mansa, área endêmica do estado do Rio de Janeiro, entre 2013 e 2019. É importante ressaltar que parte dessa amostra foi coletada retrospectivamente. Todos os cães eram sorologicamente positivos para infecção por *Leishmania* spp. pelas técnicas de imunocromatografia de duplo percurso (DPP®) e de ensaio Imunoenzimático (ELISA). Cada um desses animais foi testado previamente pela técnica de DPP® pela Secretaria Municipal de Saúde de Barra Mansa e pela técnica de ELISA pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) do estado do Rio de Janeiro. Foram selecionados cães cujas amostras de medula óssea (aspirados para *cell-block* e fragmentos de osso esterno) coletadas entre 2013 e 2019 estivessem viáveis e disponíveis.

#### 4.1.1 Critérios de inclusão

- Cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania* nas técnicas de DPP® e ELISA e com confirmação parasitológica pela técnica de cultura em amostras de medula óssea, baço, pele ou linfonodo.

#### 4.1.2 Critérios de exclusão

- Cães com amostras biológicas de medula óssea insuficientes para realização de todas as técnicas de diagnóstico utilizadas no estudo.
- Cães cujas fichas clínicas ou blocos histológicos não estivessem arquivados
- Cães com cultura parasitológica ausente ou negativa para as amostras de medula óssea, baço, pele e linfonodo, concomitantemente.

### 4.2 EXAME CLÍNICO, NECROPSIA E COLETA DE AMOSTRAS

Os cães soropositivos foram encaminhados para eutanásia no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses (Lapclin-Dermzoo), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), como medida de controle preconizada pelo Ministério da Saúde (2006). Esses cães foram sedados com cloridrato de quetamina (10 mg/kg) em associação ao maleato de acepromazina (0,2 mg/kg) via intramuscular, antes do exame clínico.

Ao exame clínico, foi realizada inspeção de pele e de mucosas oral e ocular, palpação de linfonodos superficiais e órgãos abdominais. Foram considerados sinais clínicos compatíveis com LVZ: caquexia, magreza, alopecia geral ou localizada, lesões cutâneas como úlceras e descamação, onicogribose, ceratoconjuntivite e aumento de linfonodos superficiais (SOUZA et al., 2014). Os cães foram classificados em: com sinais clínicos e sem sinais clínicos compatíveis com LVZ. Por sua vez, os cães com sinais clínicos foram classificados em: cães com poucos sinais clínicos (até 2 sinais clínicos compatíveis com LVZ) e com muitos sinais clínicos (mais de três sinais clínicos de LVZ), baseado em Souza et al. (2014).

Observado o devido relaxamento em cada animal sedado, foi realizada punção aspirativa de medula óssea do manúbrio esternal usando seringa de 20 mL e agulha 40x12 mm, após tricotomia e antissepsia da região e aplicação local da lidocaína 2% (Figura 5).

**Figura 5-** Punção aspirativa de medula óssea em cão



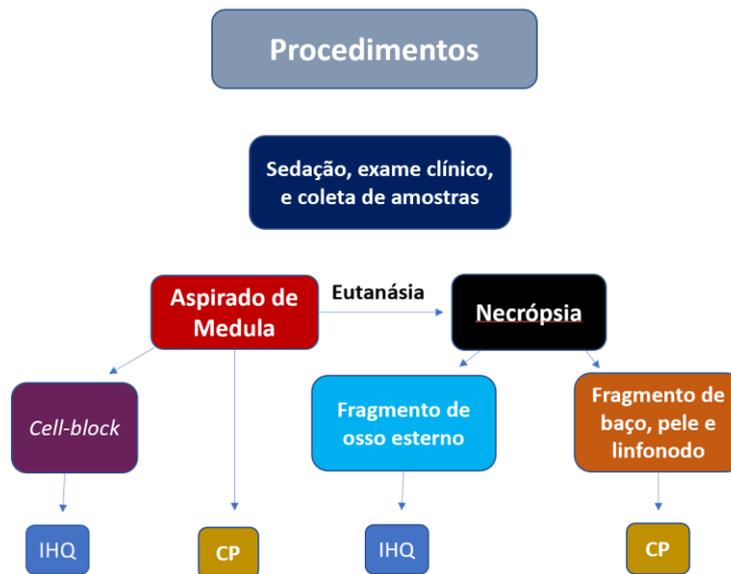
FONTE: Lapclin-Dermzoo – INI

A amostra de aspirado de medula óssea foi dividida em dois tubos estéreis com EDTA (VACUETTE® K3, 4 mL). Um tubo foi utilizado para cultura e isolamento de *Leishmania* spp. e o outro para obtenção de *cell-block* e realização de IHQ, para detectar formas amastigotas de *Leishmania* spp. As amostras foram armazenadas em refrigerador e enviadas ao laboratório para serem processadas.

Em seguida, os cães foram submetidos à eutanásia através de administração por via endovenosa de tiopental sódico e cloreto de potássio, em *overdose*. Na necropsia, foram coletados de forma estéril amostras de pele, linfonodo poplíteo e baço. Essas amostras foram acondicionadas em solução salina estéril contendo antimicrobianos para cultura parasitológica, seguida da técnica de EEML (eletroforese de enzimas *multilocus*) para diagnóstico de *L.*

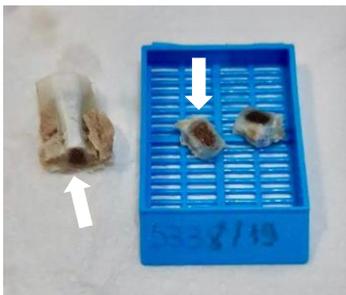
*infantum* (Figura 6). Também foi coletado fragmento do manúbrio do osso esterno contendo medula óssea (Figura 7), que foi fixado imediatamente em formalina tamponada a 10% para realização das técnicas de imuno-histoquímica.

**Figura 6-** Fluxograma de procedimentos para coleta de amostras e exames laboratoriais



Legenda: IHQ- Imuno-histoquímica; CP- Cultura Parasitológica

**Figura 7 -** Fragmentos de osso esterno contendo medula óssea (indicados pelas setas)



FONTE: Autora

#### 4.3 CULTURA PARASITOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA

A cultura parasitológica foi realizada no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do INI/ Fiocruz. As amostras de aspirado de medula óssea e fragmentos de baço, pele e linfonodo foram mergulhadas imediatamente em solução salina, semeadas em meio de cultura bifásico NNN (Novy, MacNeal e Nicolle) acrescido de Schneider Medium Insect (Sigma-

Aldrich) contendo 10% de soro fetal bovino e incubadas a 26-28 °C. As promastigotas de *Leishmania* isoladas foram identificadas por EEML (CUPOLILLO et al., 1994, MADEIRA et al., 2009).

#### 4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA

As amostras de aspirado de medula óssea e de osso esterno foram encaminhadas ao Serviço de Anatomia Patológica do INI, para realização da técnica de imuno-histoquímica.

##### 4.4.1 Clivagem do *Cell-block* de aspirados de medula óssea

Os tubos de EDTA contendo aspirado de medula óssea foram centrifugados a 1350 g por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado com auxílio de pipeta descartável. Em seguida, a solução fixadora para *cell-block* (850 mL de álcool absoluto, 100 mL de formaldeído a 37% e 50 mL de ácido acético) foi adicionada ao tubo de EDTA lentamente de forma a evitar o turbilhonamento do sedimento contendo leucócitos e hemácias, até atingir o volume de 5 mL. O turbilhonamento em questão impediria a formação de capa leucocitária, a partir da qual podem ser detectadas as formas amastigotas (Figura 8). Essa mistura foi submetida a um repouso mínimo de 24 horas para completa fixação e formação do *cell-block*. Realizou-se, em seguida, o descarte da solução fixadora em recipiente adequado (Figura 9).

Somente então, o *cell-block* foi clivado (Figuras 10, 11 e 12) e processado rotineiramente para ser emblocado em parafina (CARSON; CAPELLANO, 2015).

**Figura 8-** Região de formação da capa leucocitária após centrifugação do aspirado de medula



FONTE: Autora

**Figura 9-** Descarte adequado da solução fixadora *cell-block*



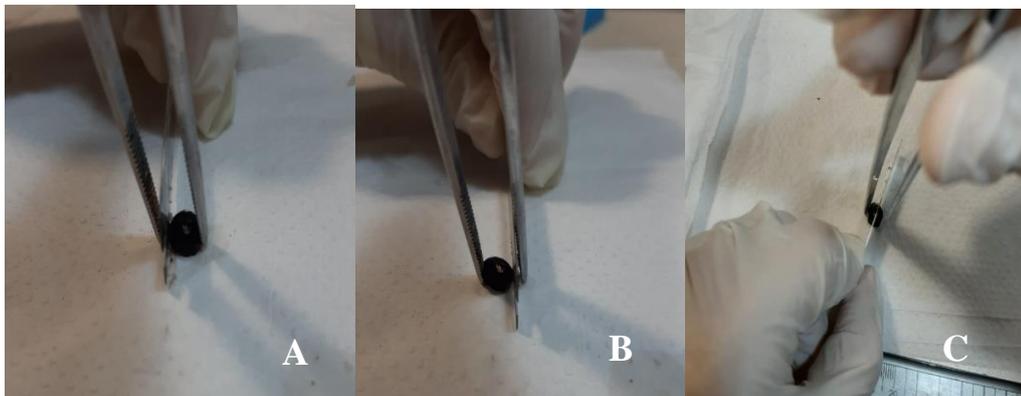
FONTE: Autora

**Figura 10 -** Deslocamento do *cell-block* de medula óssea do tubo de EDTA: *Cell-block* sendo pressionado com a ponta da pinça (A), utilização da pinça para efetuar leves batidas no tubo invertido com a amostra em iminente descolamento (B) e (C) amostra pronta para clivagem.



FONTE: Autora

**Figura 11–** Desbastamentos laterais do *cell-block* de medula óssea (A e B) e secção mediana na clivagem (C).



FONTE: Autora

**Figura 12** – Aspecto do *cell-block* de medula óssea após clivagem

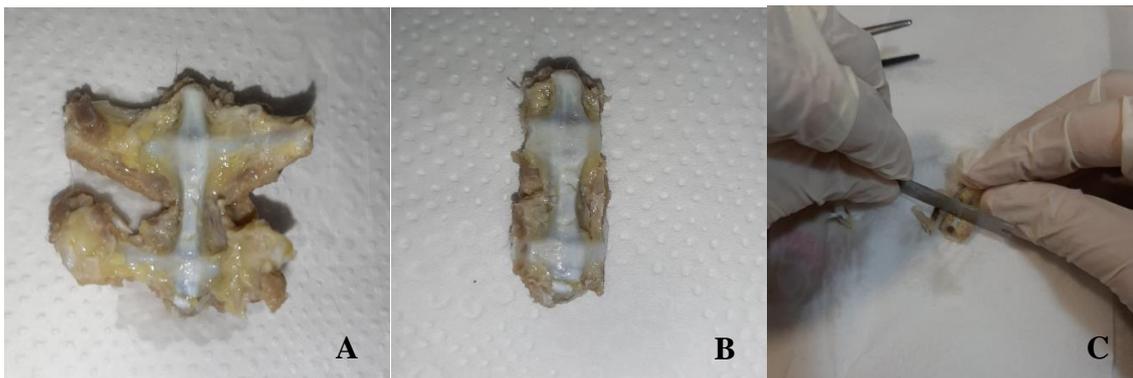


FONTE: Autora

#### 4.4.2 Clivagem dos fragmentos de osso esterno contendo medula óssea

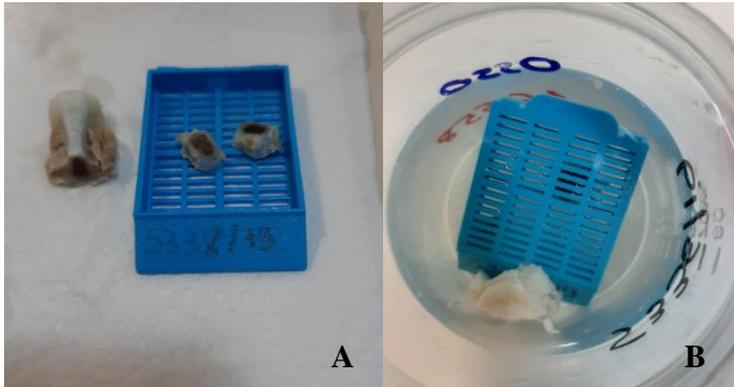
As amostras de manúbrio do osso esterno foram clivadas (Figura 13), acondicionadas (Figura 14) e descalcificadas com ácido nítrico a 10% (Figura 15) até que apresentassem amolecimento suficiente para a rotina de processamento histológico (mínimo de 24 horas). Após a descalcificação, essas amostras foram processadas rotineiramente para emblocamento em parafina (CARSON; CAPELLANO, 2015).

**Figura 13**– Etapas da clivagem de amostra de osso esterno: fragmento obtido após a necropsia (A), retirada do gradil costal e da musculatura inerentes (B) e corte seccional evidenciando a medula óssea (C)



FONTE: Autora

**Figura 14:** Osso esterno clivado no interior do cassete (A) e acondicionado com reserva em formalina (B)



FONTE: Autora

**Figura 15:** Osso esterno durante o processo de descalcificação em ácido nítrico.



FONTE: Autora

#### 4.4.3 Processamento dos cortes histológicos pela imuno-histoquímica

Dando prosseguimento ao estudo, para realização da técnica de IHQ, cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$  dos blocos de parafina contendo os respectivos tecidos foram colocados em lâminas silanizadas (Erviagas, ERV – SF PLUS). A técnica de IHQ foi concluída em dois dias consecutivos. No primeiro dia, foi realizada a desparafinização das lâminas a 60°C por 10 minutos, tendo sido mergulhadas em xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Em seguida, foram lavadas em água corrente por pelo menos 5 minutos. Na etapa seguinte, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena dos cortes histológicos. Para esse fim, foi preparada a solução de bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se 55 mL de álcool metílico para 45 mL de peróxido de hidrogênio 30% por 40 min, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Para cada 25 lâminas utilizamos um volume de 200 mL da solução. A próxima etapa realizada foi a de recuperação antigênica, na qual as lâminas com os cortes foram inseridas em cubas preenchidas com tampão citrato (pH=6). As cubas com as lâminas foram incubadas

a 65°C por 30 minutos em banho-maria. Após o esfriamento total das lâminas, foi realizada a lavagem por 5 a 10 minutos na água corrente e utilizada uma caneta hidrofóbica (Dako pen) para contornar os cortes histológicos. Foi instilada nos cortes uma solução bloqueadora de proteínas Lab Vision™ Ultra V Block (Thermo Scientific, California, EUA) a temperatura ambiente, deixando-a agir por 10 minutos. A seguir, foi aplicada sobre as lâminas a solução TBS (Tris-Buffered-Saline, TBS IHC Wash Buffer with Tween 20, Cell Marque, Rocklin, California, EUA), deixando-as em repouso por 5 minutos. Foi retirada a solução de TBS (escorre-se a mesma, realizando pequenas batidas na bandeja) e aplicado o soro policlonal anti-*Leishmania* na diluição 1:500, deixando as lâminas na bandeja em câmara úmida na geladeira entre 2 e 8°C *overnight*. O soro anti-*Leishmania* foi produzido pelo Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses do INI, Fiocruz, por imunização de coelhos com formas promastigotas de *L. chagasi*, seguindo o protocolo de Quintella et al. (2009).

No segundo dia, a reação para detecção de *Leishmania* spp. foi desenvolvida usando o Kit The HiDef Detection™ HRP Polymer System (Cell Marque, Massachusetts, EUA), de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante, conforme descrito a seguir. Após incubação com anticorpo anti-*Leishmania* spp., os cortes histológicos foram submetidos a duas lavagens de 5 minutos com solução TBS. Em seguida, os cortes histológicos foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente com o amplificador do kit. Após esses 20 minutos, os cortes foram submetidos a duas lavagens de 5 minutos com TBS. Após, as lavagens os cortes histológicos foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente com polímero detector conjugado à peroxidase. Após mais duas lavagens de 5 minutos com TBS, os cortes foram incubados com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, EUA). As formas amastigotas foram marcadas em castanho pela reação do cromógeno DAB com a peroxidase. Após esta etapa, os cortes foram lavados com três banhos em água destilada durante 2 minutos e, logo após, submetidos à contra coloração com hematoxilina de Harris.

Para montagem, as lâminas foram imersas em água destilada durante 1 minuto, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e montadas em meio de montagem entellan (Merck).

Cortes histológicos de tecidos intensamente parasitados com formas amastigotas de *Leishmania* foram incubados com soro homólogo não-imune como controle negativo e com soro policlonal de coelho anti-*Leishmania* como controle positivo.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos das culturas parasitológicas, do levantamento das fichas clínicas e da leitura de todas as lâminas de IHQ foram armazenados em Excel® e analisados usando o pacote estatístico R versão 3.6.2 (R CORE TEAM, 2019), através da interface R Studio versão 1.2 (R STUDIO TEAM, 2019). As frequências de positividade, com respectivos intervalos de confiança de 95% das técnicas, foram calculadas usando a cultura parasitológica como padrão de referência. Foram utilizados dois padrões de referência: cultura parasitológica positiva de aspirado de medula óssea e cultura parasitológica positiva de fragmentos de baço, pele, linfonodo ou medula óssea. Foram avaliadas as associações entre as variáveis quantitativas e foram utilizados gráficos do tipo Boxplot e o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Utilizou-se o Teste Qui-quadrado ( $X^2$ ) com correção de Yates e o Teste exato de Fisher para a comparação entre as frequências de positividade obtidas pela técnica de IHQ segundo o tipo de amostra (*cell-block* de aspirado medular e fragmento do osso esterno contendo medula óssea) quanto à presença ou ausência de sinais clínicos, bem como para avaliar se a presença ou ausência de capa leucocitária influenciou na positividade das técnicas de IHQCB e de IHQOE (PETT, 2016).

Para avaliar a concordância entre as técnicas de imuno-histoquímica usando *cell-block* de aspirado de medula óssea (IHQCB) e imuno-histoquímica de fragmento de osso esterno contendo medula óssea (IHQOE), foi utilizado o índice Kappa que admite as seguintes classificações, segundo Landis & Koch (1977): ruim ( $\kappa < 0,00$ ); fraca (0,00 a 0,20); razoável (0,21 a 0,40); moderada (0,41 a 0,60); substancial (0,61 a 0,80) ou quase perfeita (0,81 a 1,00).

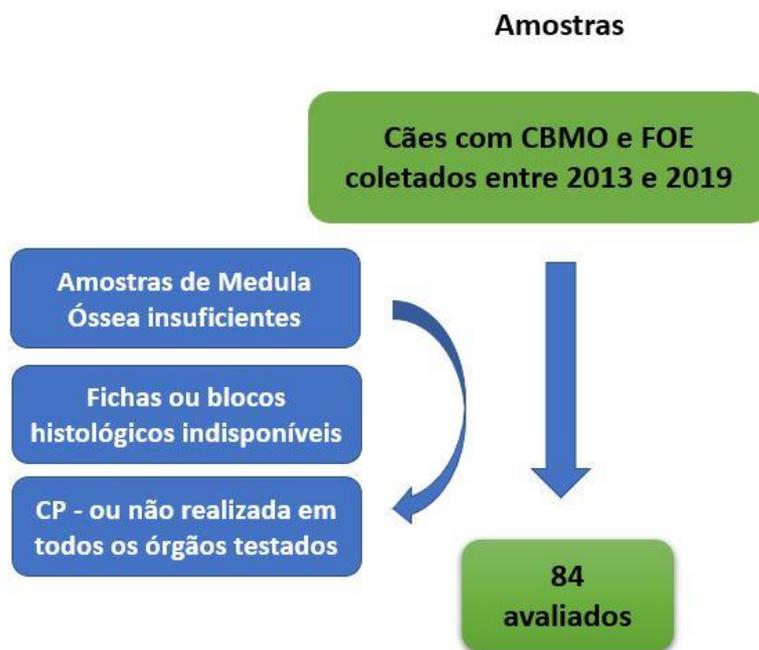
## 5 ASPECTOS ÉTICOS

Os procedimentos realizados nos cães foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Laboratório (CEUA/FIOCRUZ), licenças LW-54/13 e LW-24/17 com termo aditivo (LW-24/17 P-51/16.4).

## 6 RESULTADOS

Foram utilizadas 150 amostras de animais (fragmentos de osso esterno contendo medula óssea e cell-block de aspirados de medula óssea) emblocadas em parafina, entre 2013 e 2019. Respeitando critérios previamente estabelecidos, 66 amostras foram excluídas e 84 amostras foram avaliadas (Figura 16).

**Figura 16:** Fluxograma das amostras selecionadas

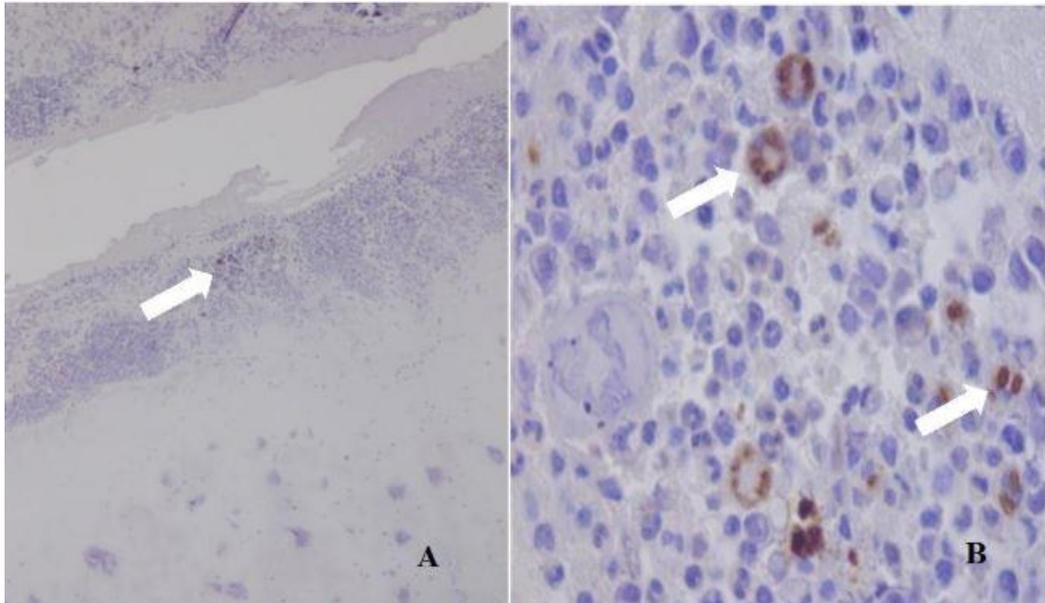


Legenda: CBMO- *Cell-block* de medula óssea; FOE- Fragmento de osso esterno; CP- Cultura parasitológica

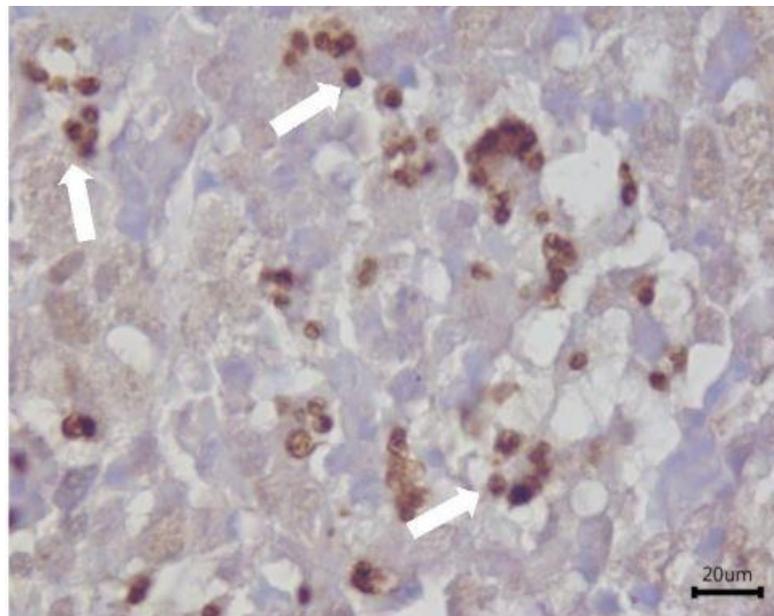
Entre os animais incluídos, 88% (74/84) apresentaram sinais clínicos e 12% (10/84) não apresentavam sinais clínicos. Foram contabilizadas 58 amostras positivas na cultura de medula óssea. Das 26 amostras negativas na CP de medula óssea, 14 (53,8%) apresentaram negatividade por contaminação microbiológica.

A positividade encontrada nas amostras medulares pode ser observada nas técnicas de imuno-histoquímica para detecção de formas amastigotas de *L. infantum* usando *cell-block* de aspirados de medula óssea (IHQCB) e de imuno-histoquímica para detecção de formas amastigotas de *L. infantum* nas amostras de medula óssea de fragmento do osso esterno (IHQOE), respectivamente, através da visualização de formas amastigotas coradas em castanho (Figura 17 e Figura 18).

**Figura 17** - Corte histológico de *cell-block* de medula óssea de cão mostrando formas amastigotas coradas em castanho (setas) no interior de macrófagos em capa leucocitária em objetiva de 4x (A) e de 40x (B). Imuno-histoquímica.



**Figura 18** - Corte histológico de fragmento de osso esterno de cão contendo medula óssea, mostrando formas amastigotas coradas em castanho (setas) no interior de macrófagos em objetiva de 40x. Imuno-histoquímica.



Usando como padrão de referência a positividade de medula óssea, pele, linfonodo ou baço na cultura parasitológica (CP), a frequência de positividade da IHQCB foi de 30,9% (26/84) (IC 95%: 21,6%; 42,1%). A frequência de positividade da IHQOE foi de 65,5% (55/84) (IC 95%: 54,2%; 75,3%), usando o mesmo padrão de referência.

O número de amostras positivas e negativas para cada técnica realizada está descrito na tabela 2.

**Tabela 2-** Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de *L. infantum* pelas técnicas de IHQ em amostras de aspirados e medula óssea de cães com infecção por *L. infantum*, usando como padrão de referência a positividade na cultura parasitológica de medula óssea, pele, linfonodo ou baço.

IHQCB	IHQOE		Total
	Positivo	Negativo	
<b>Positivo</b>	4	22	26
<b>Negativo</b>	51	7	58
<b>Total</b>	55	29	84

IHQCB: Imuno-histoquímica usando *Cell-block*; IHQOE: Imuno-histoquímica de fragmento de osso esterno.

As frequências de positividade da técnica de IHQCB para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* em amostras de medula óssea de cães na presença ou ausência de sinais clínicos foram 29,7% (22/74) e 40,0% (4/10), respectivamente, usando como padrão de referência a positividade de medula óssea, pele, linfonodo ou baço (Tabela 3).

**Tabela 3-** Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de *L. infantum* pela técnica de IHQCB de aspirados e medula óssea de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos, usando como padrão de referência a positividade de medula óssea, pele, linfonodo ou baço

IHQCB	Sinais Clínicos				Total	
	Presentes		Ausentes		N	%
	N	%	N	%		
<b>Positivo</b>	22	26,2	4	4,8	26	31
<b>Negativo</b>	52	61,9	6	7,1	58	69
<b>Total</b>	74	88,1	10	11,9	84	100

IHQCB: Imuno-histoquímica usando *Cell-block*; N: número de amostras

Não se observou associação entre os resultados da técnica de IHQCB em amostras de aspirados de medula óssea e o estado clínico do animal, ao nível de 5% de significância ( $X^2$  com correção de Yates = 0,087;  $p = 0,768$ ), ou seja, ser positivo ou não nesta técnica independe da presença ou ausência de sinal clínico de LV nos cães.

As frequências de positividade da técnica de IHQOE na presença ou ausência de sinais clínicos foram de 66,2% (49/74) e 60,0% (6/10), respectivamente, usando como padrão de referência a positividade da cultura de medula óssea, pele, linfonodo ou baço (Tabela 4).

**Tabela 4-** Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de *L. infantum* pela técnica de IHQOE de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos, em cães com infecção por *L. infantum* confirmada pela cultura parasitológica de pele, baço, MO ou linfonodo.

IHQOE	Sinais Clínicos				Total	
	Presentes		Ausentes		N	%
	N	%	N	%		
<b>Positivo</b>	49	58,3	6	7,1	55	65,5
<b>Negativo</b>	25	29,8	4	4,8	29	34,5
<b>Total</b>	74	88,1	10	11,9	84	100,0

IHQOE: Imuno-histoquímica de osso esterno; N: número de amostras.

Não foi verificada associação entre os resultados da técnica de IHQOE e o estado clínico do animal ao nível de 5% de significância ( $X^2 = 0,001$  e p-valor = 0,973). Esse resultado evidencia que a detecção do parasito pela IHQOE independe da presença ou ausência de sinais clínicos de LV nos cães.

Levando em consideração que 69,0% (58/84) dos cães incluídos apresentaram CP positiva para medula óssea, foram construídas as tabelas 5, 6 e 7.

Usando como padrão de referência a positividade de medula óssea na cultura parasitológica (CP), a frequência de positividade de IHQCB foi de 29,3% (17/58) (IC 95%: 18,4%; 42,9%). Na IHQOE, a frequência de positividade foi de 63,8% (37/58), usando o mesmo padrão de referência (IC 95%: 63,8; 75,7%)

O número de amostras positivas e negativas para cada técnica realizada está descrito na tabela 5.

**Tabela 5-** Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de *L. infantum* pelas técnicas de IHQCB e IHQOE em amostras medula óssea de cães com infecção por *L. infantum* confirmada pela cultura parasitológica de medula óssea.

IHQCB	IHQOE		Total
	Positivo	Negativo	
<b>Positivo</b>	16	1	17
<b>Negativo</b>	21	20	41
<b>Total</b>	37	21	58

IHQCB: Imuno-histoquímica usando *Cell-block*; IHQOE: Imuno-histoquímica de fragmento de osso esterno.

A frequência de positividade da técnica de IHQCB para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* em amostras de medula óssea de cães na presença ou ausência de sinais clínicos foi de 27,4% (14/51) e 42,9% (3/7), respectivamente, usando como padrão de referência a positividade da cultura de medula óssea (tabela 6).

**Tabela 6-** Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de *L. infantum* pela técnica de IHQCB de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos, em amostras de medula óssea de cães com infecção por *L. infantum* confirmada pela cultura parasitológica de medula óssea.

IHQCB	Sinais Clínicos				Total	
	Presentes		Ausentes		N	%
	N	%	N	%		
<b>Positivo</b>	14	24,1	3	5,2	17	29,3
<b>Negativo</b>	37	63,8	4	6,9	41	70,7
<b>Total</b>	51	87,9	7	12,1	58	100,0

IHQCB: Imuno-histoquímica usando *Cell-block*; N: número de amostras

As frequências de positividade da técnica de IHQOE para detecção de *L. infantum* em amostras de medula óssea de cães na presença ou ausência de sinais clínicos foi de 62,7% (32/51) e 71,4% (5/7) usando a CP de medula óssea como referência, respectivamente.

Comparando a positividade na técnica de IHQOE de medula óssea na presença ou ausência de sinais clínicos, utilizando a cultura de medula óssea como referência, foi montada a tabela 7.

**Tabela 7-** Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de *L. infantum* pela técnica de IHQOE de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos, em amostras de medula óssea de cães com infecção por *L. infantum* confirmada pela cultura parasitológica de medula óssea.

IHQOE	Sinais Clínicos				Total	
	Presentes		Ausentes		N	%
	N	%	N	%		
<b>Positivo</b>	32	55,2	5	8,6	37	63,8
<b>Negativo</b>	19	32,8	2	3,4	21	36,2
<b>Total</b>	51	88,0	7	12,0	58	100,0

IHQOE: Imuno-histoquímica de fragmento de osso esterno; N: número de amostras.

Na avaliação de concordância entre IHQCB e IHQOE, foi observada concordância razoável, com valor do índice Kappa igual a 34% (IC 95%: 15%; 52%).

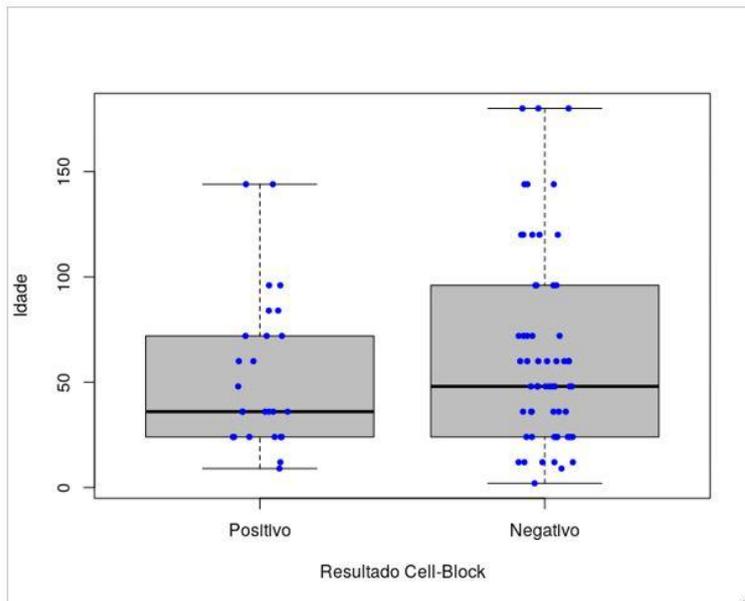
No total de 84 amostras de medula óssea processadas pela técnica de IHQCB, em 25 (31%) foi observada capa leucocitária. Nessas 25 amostras com capa leucocitária, 10 (40%) foram positivas para formas amastigotas de *Leishmania* spp. pela técnica de IHQCB. Nas 59 amostras de medula óssea submetidas à técnica de IHQCB nas quais houve ausência de capa leucocitária, 16 (27%) foram positivas para formas amastigotas de *Leishmania* spp. Entretanto, não houve relação estatisticamente significativa entre a presença ou a ausência de capa leucocitária na positividade da IHQCB nesse estudo, o que foi verificado através do Teste exato de Fisher, p-valor=0,303.

Neste estudo foram coletadas amostras em 33 fêmeas e 51 machos. Ser fêmea ou macho não influenciou na positividade ou negatividade da IHQCB ( $X^2=0,010$ , p-valor=0,917). O sexo também não influenciou na positividade da IHQOE ( $X^2=0,980$ , p-valor=0,322). Em relação à presença ou ausência de sinais clínicos em função da raça não houve associação ( $X^2=9,763$ , p-valor= 0,999), tendo 88,7% (63/71) dos animais SRD (sem raça definida) apresentado sinais clínicos. Já entre os animais com raça definida 84,6% (11/13) apresentaram sinais clínicos.

É importante mencionar que, entre os animais utilizados no estudo, 84,5% (71/84) eram SRD. Ter ou não raça definida não teve relação com a positividade ou a negatividade da IHQCB, o que foi avaliado pelo Teste exato de Fisher (p-valor=0,631). O mesmo ocorreu na IHQOE (p-valor=0,125).

A idade dos animais utilizados no estudo oscilou entre 2 e 180 meses. Não houve associação entre idade e positividade ou negatividade da IHQCB nesse estudo, como pode ser observado no Boxplot (figura 18) e pelo Teste de Mann-Whitney ( $W=678$ , p-valor=0,4622).

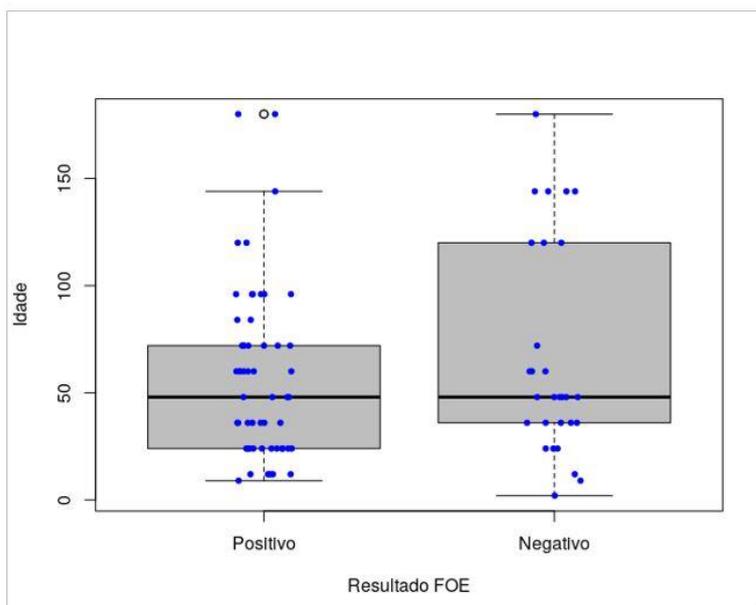
**Figura 18-** Boxplot mostrando a associação entre idade (meses) e positividade na IHQCB.



IHQCB: Imuno-histoquímica usando *Cell-block*

De forma semelhante, não houve associação entre idade e positividade ou negatividade da IHQ utilizando fragmentos de osso esterno (FOE), como pode ser observado no Boxplot (figura 19) e pelo Teste de Mann-Whitney ( $W=748$ ,  $p\text{-valor}=0,642$ ). A idade mediana foi praticamente a mesma para as amostras que obtiveram positividade ou negatividade na IHQOE.

**Figura 19-** Boxplot mostrando a associação entre idade (meses) e positividade na IHQOE.



IHQOE: Imuno-histoquímica de fragmento de osso esterno. FOE: Fragmento de osso esterno

## 7 DISCUSSÃO

A técnica de IHQCB apresentou baixa frequência de positividade em ambos os padrões de referência. Entretanto, outros autores tiveram resultados melhores para essa técnica tanto em medula óssea como em linfonodo de cães e a consideraram uma boa técnica para o diagnóstico da LVC, sendo útil para o refinamento do diagnóstico parasitológico direto em cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. (ABRANTES et al., 2016; GUERRA et al., 2019; MENEZES et al., 2016). Abrantes et al. (2016) mostraram que a IHQCB de aspirados de medula óssea apresentou os melhores resultados comparada aos outros exames parasitológicos em fragmentos de pele (IHQ, HP e CP) e de MO (CP) no diagnóstico de *L. infantum* em área previamente não afetada pela doença. Em 145 cães, 25% foram soropositivos, 4% foram positivos na técnica de IHQCB de medula óssea e 2% foram positivos na cultura parasitológica de pele ou medula óssea. Adicionalmente, a IHQCB detectou um caso negativo na sorologia e demais técnicas parasitológicas (IHQ de pele, HP de pele e CP). As frequências de positividade gerais da técnica de IHQCB nesse estudo, usando a CP positiva como padrão de referência, foram semelhantes à frequência de positividade de 31,1% encontrada por Menezes et al. (2016) utilizando a mesma técnica em aspirados de medula óssea. Entretanto, a comparação com os resultados quanto às frequências de positividade é limitada, pois esses autores não utilizaram uma técnica padrão de referência positiva para selecionar os cães. No estudo de Menezes et al. (2016), os 45 cães estudados eram de área endêmica para LVZ, porém sem diagnóstico prévio de *L. infantum* realizado nos cães. Esses autores também relataram que a técnica de IHQCB, obteve uma frequência de positividade superior à de cultura parasitológica (13,3%) e de histopatologia (8,9%). Guerra et al. (2019), ao avaliarem a técnica de IHQCB em aspirados de linfonodos por agulha fina em cães positivos para *L. infantum* na PCR e sorologia, encontraram uma frequência de positividade de 70%, bem superior à técnica de citopatologia, que foi de 32%.

Uma possível explicação para o baixo desempenho na detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. na medula óssea de cães pela técnica de IHQCB, no presente estudo, diferente de Abrantes et al. (2016) e Menezes et al. (2016), pode ter sido a não formação da capa leucocitária em mais da metade das amostras estudadas. Isso porque, embora não tenha sido encontrada diferença significativa estatisticamente, a frequência de positividade para formas amastigotas de *Leishmania* no presente estudo foi superior em 13% quando havia a capa leucocitária em comparação com as amostras sem a formação da capa leucocitária. Segundo Menezes et al. (2016), a boa capacidade de detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp.

pela técnica de IHQCB em aspirados de medula óssea pode ser compreendido pelo fato de que as células são centrifugadas e leucócitos são concentrados nos cortes histológicos, formando uma capa leucocitária. Nesses concentrados de leucócitos, são encontradas as células infectadas por *Leishmania* spp. A não formação da capa leucocitária em diversas amostras do presente estudo pode estar relacionada a um quadro de leucopenia, que é frequentemente observado em cães com LVZ (PALTRINIERI et al., 2016). Uma outra hipótese, é que o volume de aspirado medular padronizado para a coleta no presente estudo tenha influenciado na formação da capa leucocitária das amostras estudadas, possivelmente subestimando as frequências de positividade da IHQCB.

Em relação ao volume máximo de aspirado medular, Paiva et al. (2014) estimaram 1mL, desprezando aspirados com grandes volumes, os quais inviabilizariam a execução da técnica de *cell-block* por conterem percentual maior de hemácias e, portanto, menor percentual de células representativas do tecido pesquisado. Abrantes et al. (2016) utilizaram 0,5mL de aspirado de medula e a mesma solução fixadora utilizada nesse estudo com bons resultados para IHQCB. Apesar disso, Menezes et al. (2016) utilizaram de 1,5 a 2mL de aspirado medular com bons resultados. Porém neste estudo, o volume coletado não ultrapassou 1mL de aspirado medular, porque volumes maiores de amostras de aspirado medular para obtenção do CB foram friáveis no momento da clivagem, ou mesmo não conseguiam ser deslocados dos tubos de EDTA. Portanto, em estudos futuros sobre a IHQCB seria interessante estabelecer o melhor volume de aspirado medular na coleta de amostras, bem como avaliar a leucometria global dos animais eutanasiados para estudar possíveis relações com a formação da capa leucocitária.

Antunes et al. (2018) compararam as técnicas de histopatologia de *cell-block* de aspirados de medula óssea (CBMO), histopatologia de biópsia de medula óssea e citologia aspirativa de medula óssea para detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp em 24 cães. Esses autores usaram como padrão de referência cães positivos para *L. infantum* na PCR e CP e consideraram a leitura de 1000 campos, bem como avaliaram a intensidade da infecção nas lâminas examinadas. Eles concluíram que a citologia apresentou maior frequência de positividade (96,5%) em relação a HP de CBMO (92,5%) e à biópsia (92,5%). Ademais, Antunes et al. (2018) observaram que a detecção da primeira forma amastigota utilizou menor número de campos na citologia e na biópsia se comparado ao CBMO. Apesar de as técnicas de citologia e CBMO terem sido coradas com HE, que é menos sensível que a IHQ, elas obtiveram desempenho superior ao do presente estudo.

Uma possível explicação para a maior sensibilidade da histopatologia em CBMO, pode ter sido o uso do gel de agarose para concentrar as células e formar o citobloco, diferente do

presente estudo, no qual foi usado solução fixadora composta por álcool absoluto, formaldeído a 37% e ácido acético. Paiva et al. (2014) obtiveram melhores resultados na obtenção de citobloco de capa leucocitária e medula óssea ao realizarem fixação dessas amostras em álcool a 95%. Portanto, tanto o uso de gel de agarose nas amostras para centrifugação, como a fixação do citobloco obtido em álcool a 95%, poderiam ser testados futuramente na técnica de IHQCB para melhorar a sua sensibilidade.

A técnica de *cell-block* combina técnicas de citopatologia e histológicas (MENEZES et al., 2016; ROWE et al., 2001). Ao comparar as frequências de positividade da técnica de IHQCB com as obtidas em outros estudos pela citopatologia e HP (coloração HE) para o diagnóstico de formas amastigotas de *L. infantum* em amostras de medula óssea, a técnica de IHQCB mostrou frequência de positividade ligeiramente superior às da HP (12 a 27%) e inferior às da citopatologia (47 a 95%) (DE MELLO et al., 2016; HONSE, 2014; MOREIRA et al., 2007). As frequências de positividade no presente estudo também foram semelhantes às da técnica de citopatologia em linfonodo (30 a 50%) (ALVAR et al., 2004; GUERRA et al., 2019). Esses resultados demonstram que a sensibilidade da técnica de IHQCB está dentro da faixa esperada para uma técnica parasitológica de rotina, que é baixa, porém com alta especificidade. Entretanto, esperava-se uma sensibilidade melhor, por utilizar a técnica de IHQ. Considerando os resultados de sensibilidade e aspectos como rapidez no diagnóstico, praticidade na execução e custo, a citopatologia seria mais vantajosa com relação à técnica de IHQCB e de histopatologia, e, portanto, mais indicada na rotina para o diagnóstico da LVC. Apesar dessas desvantagens, a técnica de IHQCB apresenta potencial, que precisa ser aprimorado. Isso porque, essa técnica comparada às técnicas de citopatologia e histopatologia mostrou uma boa capacidade de detecção de formas amastigotas em cães sem sinais clínicos, ligeiramente superior a encontrada em cães com sinais clínicos no presente estudo. Essa frequência de positividade foi bem superior à encontrada para técnica de citopatologia (14,6%) e histopatologia (21,7%) em cães sem sinais clínicos, nos quais foram examinadas amostras de medula óssea (MOREIRA et al., 2007; SARIDOMICHELAKIS et al., 2005).

Teixeira et al. (2019) relataram em uma população de cães predominantemente assintomáticos, residentes em área endêmica de leishmaniose visceral, sensibilidades de testes sorológicos de 21,74% no TR-DPP, 11,59% no EIE-LVC, 37,68% no ELISA rK39 e 18,84% no DAT-Canis. Laurenti et al. (2013) demonstraram que diferentes estados clínicos foram potencialmente infecciosos para os vetores, mas cães assintomáticos possibilitaram a infecção de um número maior de flebotomíneos, indicando que cães sem sinais clínicos de leishmaniose visceral eram mais competentes para transmitir parasitas para o vetor. Também sugeriram que

cães assintomáticos desempenham um papel importante na epidemiologia leishmaniose visceral, mantendo o ciclo da doença em áreas endêmicas. Segundo Abrantes et al. (2016), a IHQCB detectou três cães positivos, sem sinais clínicos, que foram negativos nas demais técnicas parasitológicas, sendo um deles negativo também em três técnicas sorológicas. Portanto, as falhas de sensibilidade de técnicas sorológicas e parasitológicas como a citopatologia e histopatologia em cães sem sinais clínicos, que são comprovadamente relevantes na transmissão da doença (LAURENTI et al., 2013), reforçam a utilidade da técnica de IHQCB. Nesse contexto, a combinação da técnica de IHQCB com a sorologia, poderia aumentar a sensibilidade na detecção dos cães sem sinais clínicos. A associação de métodos parasitológicos distintos é sugerida por Boelaert et al. (2007) em prol do aumento da sensibilidade diagnóstica.

Outras vantagens da IHQCB, além da boa capacidade de detecção de cães sem sinais clínicos infectados por *L. infantum*, são a facilidade, rapidez e segurança de coleta das amostras de medula óssea, o fácil armazenamento e transporte das amostras, a possibilidade de armazenamento por longos períodos, permitindo estudos retrospectivos e prevenindo perdas com contaminação microbiológica como na cultura parasitológica (ANTUNES et al., 2018; MAIA; CAMPINO, 2008; PAPARCONI et al., 2013). Portanto, é uma técnica cuja coleta de amostra para sua realização pode ser utilizada em regiões distantes, sem infraestrutura laboratorial disponível e o seu envio para os laboratórios de diagnóstico é seguro, sendo recomendada para trabalhos de campo e pesquisas de larga escala (ABRANTES et al., 2016; MENEZES et al., 2016).

A frequência de positividade da técnica de IHQOE foi satisfatória para uma técnica parasitológica usando como padrão de referência a CP, para cães com e sem sinais clínicos. Além disso, a técnica de IHQOE apresentou maiores frequências de positividade se comparada à IHQCB, independentemente do padrão de referência utilizado (cultura de medula óssea ou de pelo menos um tecido coletado positivo). A concordância entre as técnicas não foi boa. Os resultados de frequência de positividade para IHQOE foram semelhantes aos obtidos por Furtado et al. (2015), equivalentes a 64,6% em amostras de aspirados de medula óssea, submetidas à IHQ, de 42 cães soropositivos da mesma região endêmica do presente estudo. Por sua vez, Toplu & Aydogan (2011), na Turquia, encontraram frequências de positividade superiores, iguais a 90,9%, e Moreira et al. (2007), em área endêmica de LVC no estado de São Paulo, relataram frequências de positividade variando de 32,0 a 58,54%, inferiores ao do nosso estudo. Essas diferentes frequências de positividade podem estar relacionadas a diversos fatores, como estágio da doença, status clínicos dos cães examinados, regiões endêmicas

distintas, bem como diferentes protocolos de IHQ e forma de seleção dos cães incluídos nesses estudos. Nesses três estudos, o desempenho da técnica de IHQ foi superior aos de outras técnicas parasitológicas avaliadas em medula óssea. Furtado et al. (2015), encontraram frequências de positividade de 53,8% para CP e de 58,5% para hibridização *in situ*. Toplu & Aydogan (2011), relataram frequências de positividade de 57,1% para citopatologia e 45,4% para histopatologia. Com base nesses resultados e nos do presente estudo, a medula óssea se mostrou uma boa amostra para diferentes técnicas de diagnóstico parasitológico de LVC. Entretanto, as frequências de positividade da IHQ e de outras técnicas parasitológicas avaliadas foram maiores nas amostras de baço e linfonodo (FURTADO et al., 2015; MOREIRA et al., 2007; TOPLU & AYDOGAN, 2011). Além de ser uma das técnicas parasitológicas mais sensíveis e de alta especificidade, a IHQ apresenta outras vantagens. Dentre essas vantagens, está o fato de a amostra coletada ser fixada em formalina tamponada a 10%, que é uma solução de baixo custo, de fácil preparo e obtenção, não sendo susceptível a contaminação microbiológica como a CP e não precisando ser mantida sob refrigeração. Essas características permitem com que a amostra biológica para técnica de IHQ possa ser coletada a campo em regiões remotas, sem estrutura laboratorial e com limitações de meios de transporte. Ademais, essa amostra, uma vez emblocada em parafina, pode ser mantida por longos períodos e permite estudos retrospectivos, como já foi dito. Entretanto, é uma técnica que apresenta falhas de sensibilidade e especificidade, que dependem da experiência do leitor (MAIA; CAMPINO, 2008). Comparada à técnica de citopatologia e histopatologia, a IHQ exige uma estrutura laboratorial mais complexa, possui custo mais elevado, a sua execução é mais laboriosa e o tempo para obtenção do resultado é maior (MENEZES et al., 2013). Uma limitação da IHQOE em relação a IHQCB, é que a coleta da amostra de osso esterno é inviável *in vivo* pela sua invasibilidade, sendo indicada apenas para o diagnóstico post mortem da infecção por *Leishmania* spp. em cães.

## 8 CONCLUSÕES

Apesar de possuir potencial de utilização como técnica parasitológica de rotina no diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães pela praticidade na coleta e preservação da amostra, a técnica de IHQCB apresentou uma baixa sensibilidade na detecção de formas amastigotas de *Leishmania* e necessita de ajustes em seu protocolo.

A técnica de IHQOE apresentou uma boa sensibilidade para detecção de formas amastigotas de *L. infantum* em cães, superior à de IHQCB, demonstrando ser uma ferramenta útil no diagnóstico *post mortem* da infecção por *L. infantum* em cães.

A baixa formação da capa leucocitária das amostras de aspirado de medula óssea nesse estudo pode estar relacionada ao desempenho inferior da IHQCB, já que a frequência de positividade da IHQCB na detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. foi maior nas amostras onde a capa leucocitária estava presente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, T. R. et al. Identification of canine visceral leishmaniasis in a previously unaffected area by conventional diagnostic techniques and cell-block fixation. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 58, n. 3, p. 1-5, 2016.

ACKERMANN, M. R. Chronic inflammation and wound healing. In: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. p. 153-91.

AKHOUNDI, M. et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Mol. Aspects Med.**, v. 57, p. 1-29, 2017.

ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALLO, J. **Manual de Imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. 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, v. 20, n. 1, p. 259-65, 2004.

ANDRADE, G. B. et al. Pathology of dogs in Campo Grande, MS, Brazil naturally co-infected with *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 23, n. 4, p. 509-15, 2014.

ANDREADOU, M. et al. Evaluation of the performance of selected in-house and commercially available PCR and real-time PCR assays for the detection of *Leishmania* DNA in canine clinical samples. **Exp. Parasitol.**, v. 131, n. 4, p. 419-24, 2012.

ANTUNES, T. R. et al. Técnicas de citologia aspirativa, biópsia e citobloco de medula óssea para identificação e determinação de intensidade parasitária na leishmaniose visceral canina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 70, n. 5, p. 1362-8, 2018.

BANETH, G. et al. **Leishmaniose canina e felina**. Madrid: Facultad de Veterinaria, 4. ed., revisado em set. 2018. E-book. Disponível em: <http://www.leishvet.org/leishmaniose-canina-e-felina/>. Acesso em 1 nov. 2019.

BENEKE, T. et al. Genetic dissection of a *Leishmania* flagellar proteome demonstrates requirement for directional motility in sand fly infections. **PLoS Pathog.**, São Francisco, v. 15, n. 6, p. 1-31, 2019.

BETINA, W. et al. Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 5, p. 353-64, 2005.

BOELAERT, M. et al. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, n. 11, p. 30-9, 2007.

BORJA, L. S. et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. **Vet. Parasitol.**, Amsterdã, v. 229, p. 110-7, 2016.

BORJA, L. S. et al. High accuracy of an ELISA test based in a flagella antigen of *Leishmania* in serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis with potential to improve the control measures in Brazil - A Phase II study. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, São Francisco, v. 12, n. 10, p. 1-14, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. SINAN: Sistema de informação de agravos de notificação. Doenças e Agravos de Notificação. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>. Acesso em 20 jun. 2018.

BRASIL. Dados epidemiológicos de Leishmaniose visceral - casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação - PA, MT, MS, RS, RJ e Município de Barra Mansa. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br>. Acesso em 9 set. 2019.

BRASIL. Secretaria Municipal de Saúde do Paraná. Exame Histopatológico. **Programa do INCA - parte VI (câncer de mama)**. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=268>. Acesso em 20 dez. 2019.

ÇAKIR, L. et al. Cytological evaluation of pleural effusion with cell block technique in a dog. **Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.**, Turquia, v. 61, p. 73-7, 2014.

CALABRESE, K. S. et al. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: Histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. **Exp. Parasitol.**, v. 124, n. 3, p. 253-7, 2010.

CAMARGO-NEVES, V. L. et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 5, p. 1263-7, 2001.

CARDOSO, J. M. O. **Implicações da evolução clínica e da carga parasitária em aspectos histopatológicos da pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum***. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2013.

CARSON, F. L.; CAPPELLANO, C.H. **Histotechnology: a self-instructional text**. 4<sup>th</sup> ed. Chicago: ASCP Press, 2015.

CÁSSIA-PIRES, R. et al. Distinct *Leishmania* species infecting wild caviomorph rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, São Francisco, v. 8, n. 12, e3389, 2014.

CASTRO-JÚNIOR, J. G. et al. Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, based on immunochromatographic dual-path platform (DPP<sup>®</sup>) and PCR assays. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 56, p. 225-9, 2014.

CAVALCANTI, M. P.; LORENA, V. M. B.; GOMES, Y. M. Avanços Biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Rev. Patol. Trop.**, Goiânia, v. 37, p. 1-14, 2008.

CHALFOUN, Y. et al. Testes diagnósticos para leishmaniose visceral - atualidade e perspectivas. **Rev. Cient. Elet. de Med. Vet.**, Garça, v. 11, p. 1-16, 2013.

CHAOUCH, M. et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Leishmania infantum* in canine leishmaniasis based on cysteine protease B genes. **Vet. Parasitol.**, Amsterdã, v. 198, n. 1-2, p. 1-264, 2013.

COLLINS, G. R. et al. The diagnostic value of cell block as an adjunct to liquid-based cytology of bronchial washing specimens in the diagnosis and subclassification of pulmonary neoplasms. **Cancer Cytopathol.**, Atlanta, v. 120, n. 2, p. 134-41, 2012.

COSTA-VAL, A. P. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune-response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Vet. J.**, Londres, v. 174, p. 636-43, 2007.

COTTERELL, S. E.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. **ASH Blood**, Washington, v. 95, n. 5, p. 1642-51, 2000.

COURA-VITAL, W. et al. Canine visceral leishmaniasis: Incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. **Vet. Parasitol.**, Amsterdã, v. 197, n. 3-4, p. 411-7, 2013.

COURA-VITAL, W. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PLoS One**, São Francisco, v. 9, n. 3, p. 1-6, 2014.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, J. R. G.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Cleveland, v. 50, n. 3, p. 296-311, 1994.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, Brasil, v. 3, n. 48, p. 151-6, 2006.

DA SILVA, A. S. et al. First Autochthonous Case of Canine Visceral Leishmaniasis in the Center of Rio Grande do Sul State, Brazil. **Acta Sci. Vet.**, Porto Alegre, v. 39, n. 2, p.1-3, 2011.

DA SILVA, E. S. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody 39 and DNA detection assays. **Vet. Res. Commun.**, v. 30, n. 6, p. 637-43, 2006.

DA SILVA, M. R.; STEWART, J. M.; COSTA, C. H. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Cleveland, v. 72, n. 6, p. 811-4, 2005.

DA SILVA, R. N. et al. Real-time PCR in clinical practice: a powerful tool for evaluating *Leishmania chagasi* loads in naturally infected dogs. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Londres, v. 104, n. 2, p. 137-43, 2010.

DA SILVA, D. A. et al. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Vet. J.**, Londres, v. 195, n. 2, p. 252-53, 2013.

DE CARVALHO, F. L. N. et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 146, n. 5, p. 571-6, 2018.

DE MELLO, C. X. et al. Thick smear is a good substitute for the thin smear in parasitological confirmation of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Cleveland, v. 95, n. 1, p. 99-103, 2016.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell Biosci.**, v. 5, n. 31, p. 1-10, 2015.

DEE, J. W.; VALDIVIESO, M.; DREWINKO, B. Comparison of the efficacies of closed trephine needle biopsy, aspirated paraffin-embedded clot section, and smear preparation in the diagnosis of bone-marrow involvement by lymphoma. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 65, n. 2, p.183-94, 1976.

DEFARGES, A. et al. Comparison of sternal, iliac, and humeral bone marrow aspiration in Beagles dogs. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 42, n. 2, p. 170-6, 2013.

ESTEVA, L.; VARGAS, C.; VARGAS DE LEÓN, C. The role of asymptomatics and dogs on leishmaniasis propagation. **Math. Biosci.**, v. 293, p. 46-55, 2017.

DE SOUZA, Y.C.P. et al. Testes diagnósticos para leishmaniose visceral – atualidades e perspectivas. **Rev. Cient. Eletron. Med. Vet.**, Garça, n. 21, p. 1-16, 2013.

EJAZI, S.A & ALI, N. Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects. **Expert Rev. Anti-infect. Ther.**, v. 11, n. 1, p. 79-98, 2013

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY PANEL ANIMAL HEALTH AND WELFARE. Scientific opinion on canine leishmaniosis. **EFSA J.**, Parma, v. 13, n. 4, p. 1-77, 2015.

FARAHMAND, M. et al. Comparison of recombinant A2-ELISA with rKE16 dipstick and direct agglutination tests for diagnosis of visceral leishmaniasis in dogs in Northwestern Iran. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 48, n. 2, p. 188-93, 2015.

FARIA, A. R. et al. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, São Francisco, v. 5, n. 9, p. 1-9, 2011.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev. Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.

FARIA A. R. et al. Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum*-Infected Dogs. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, São Francisco, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2015.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clin. Vet.**, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FERNANDES, N. C. C. A. et al. Liquid-based cytology and cell block immunocytochemistry in veterinary medicine: comparison with standard cytology for the evaluation of canine lymphoid samples. **Vet. Comp. Oncol.**, v. 1, p. 107-16, 2015.

FERREIRA, S. A. et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, São Francisco, v. 6, n. 4, p. 1-9, 2012.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis: an update. **Proceedings of the international canine leishmaniasis forum, 1999**. Sevilha: Hoechst Roussel Vet, p. 6-10, 2002.

FIELD, A. S.; GEDDIE, W. R. Role of Fine Needle Aspiration Biopsy Cytology in the Diagnosis of Infections. **Diagn. Cytopathol.**, v. 44, n. 12, p. 1024-38, 2016.

FIGUEIREDO, F. B. et al. Efficacy of an indirect immunofluorescence test in the diagnosis of canine leishmaniosis. **Vet. J.**, v. 186, n. 1, p. 123-4, 2010.

FIGUEIREDO, F. B. et al. Relato de caso autóctone de leishmaniose visceral canina na zona sul do município do Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 43, n. 1, p. 98-9, 2010.

FIGUEIREDO, F. B. et al. Leishmaniose visceral canina: dois casos autóctones no município de Florianópolis, Estado de Santa Catarina. **Acta Sci.Vet.**, Porto Alegre, v. 40, n. 1, p. 1026-30, 2012.

FIGUEIREDO, F. B. et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 11, p. 1-7, 2018.

FRAGA, D. B. M. et al. The Rapid Test Based on *Leishmania infantum* Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, São Francisco, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2016.

FRAGA, D. B. M. et al. A multicentric evaluation of the recombinant *Leishmania infantum* antigen-based immunochromatographic assay for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasit. Vectors**, v. 7, p. 136-40, 2014

FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, Amsterdã, v. 111, n. 2-3, p. 161-73, 2003.

FURTADO, M. C.; MENEZES, R. C.; KIUPEL, M. et al. Comparative study of *in situ* hibridization, immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniasis. **Parasit. Vectors**, v. 8, n. 620, p. 1-5, 2015.

GAO, C. H. et al. Development of a LAMP assay for detection of *Leishmania infantum* infection in dogs using conjunctival swab samples. **Parasit. Vectors**, v. 8, n. 370, 2015.

GEORGIADOU, S. P.; MAKARITSIS, K. P.; DALEKOS, G. N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **J. Transl. Int. Med.**, v. 3, n. 2, p. 43-50, 2015.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **J. Comp. Pathol.**, v. 135, n. 2-3, p. 100-7, 2006.

GONÇALVES, S. C. et al. Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of leishmaniasis. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, Botucatu, v. 18, n. 2, p. 188-97, 2012.

GONTIJO, C. M.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-49, 2004.

GOYAL, S.; SINGH, U. R.; RUSIA, U. Comparative evaluation of bone marrow aspirate with trephine biopsy in hematological disorders and determination of optimum trephine length in lymphoma infiltration. **Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.**, Parma, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2014.

GREFTE, J. M. M. et al. Improved identification of malignant cells in serous effusions using a small, robust panel of antibodies on paraffin-embedded cell suspensions. **Acta Cytol.**, Basileia, v. 52, n. 1, p. 35-44, 2008.

GRIMALDI, G. Jr. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP<sup>®</sup> CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Oxford, v. 106, n. 1, p. 54-9, 2012.

GRYNPAS, M. D. et al. Changes in bone mineralization, architecture and mechanical properties due to long-term (1 year) administration of pamidronate (APD) to adult dogs. **Osteoporos. Int.**, v. 2, n. 2, p. 74-81, 1992.

GUERRA, J. M. et al. Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras de tecidos caninos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 75, n. 1686, p. 1-10, 2016.

GUERRA, J. M. et al. Evaluation of Cytopathological Techniques for the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniosis with Lymph Node Samples. **J. Comp. Pathol.**, v. 172, p. 62-71, 2019.

HONSE, C. O. **Avaliação citopatológica da medula óssea e perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2014. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Panorama do município de Barra Mansa/Rio de Janeiro/Brasil. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rj/barra-mansa/panorama>. Acesso em: 1 nov. 2019.

KASE, S. et al. Diagnostic efficacy of cell block method for vitreoretinal lymphoma. **Diagn. Pathol.**, v. 11, n. 29, p. 29-34, 2016.

KENNER, J. R. et al. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. **J. Cutan. Pathol.**, v. 26, n. 3, p. 130-6, 1999.

KHAN, M. G. M. et al. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. **Parasit. Vectors**, v. 5, n. 280, p. 1-8, 2012.

KUHN, K. et al. **Using climate to predict infectious disease epidemics**. Geneva: WHO Press, 2005.

KUMAR, P. V. et al. Visceral leishmaniasis: bone marrow biopsy findings. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 29, n. 2, p. 77-80, 2007.

JUNIOR, M.S.C.L et al. Sensitivity of PCR and real-time PCR for the diagnosis of human visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Asian Pac. J. Trop. Dis.**, Mumbai, v. 3, n. 1, p. 10-5, 2013.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Int. Biom. Soc.**, Washington, v. 33, n. 1, p. 159-74, 1977.

LARSON, M. et al. Semi-quantitative measurement of asymptomatic *L. infantum* infection and symptomatic visceral leishmaniasis in dogs using Dual-Path Platform<sup>®</sup> CVL. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 101, n. 1, p. 381-90, 2017.

LARUE, S. M. et al. Biópsia óssea. In: BOJRAB, M. J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2005. p. 794-7.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral canina. **Bol. Epidemiol. Paul.**, São Paulo, v. 6, n. 67, p. 13-23, 2009.

LAURENTI, M. D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Vet. Parasitol.**, Amsterdã, v. 196, n. 3-4, p. 296-300, 2013.

LAURENTI, M D et al. Comparative evaluation of the DPP<sup>®</sup> CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, Amsterdã, v. 205, n. 3-4, p. 444-50, 2014.

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

LIRA, R. A. et al. Canine visceral leishmaniasis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Vet. Parasitol.**, Amsterdã, v. 137, n. 1-2, p. 11-6, 2006.

MADEIRA, M. F. et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target? **Res. Vet. Sci.**, v. 87, n. 2, p. 260-2, 2009.

MAHMUD, I. C. et al. Epidemiological aspects of the first human autochthonous visceral leishmaniasis cases in Porto Alegre, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 23, n. 2, p. 124-9, 2019.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet. Parasitol.**, Amsterdã, v. 158, p. 274-87, 2008.

MAIA, C. et al. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. **Vet. Parasitol.**, Amsterdã, v. 174, n. 3-4, p. 336-40, 2010.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. **J. Trop. Med.**, v. 2012, p. 1-7, 2011.

MANNA, L. et al. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, Amsterdã, v. 142. n. 3-4, p. 271-80, 2006.

MATOS, H. J. et al. Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças. **Rev. Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 6, n. 1, p. 65-8, 2015.

MELLO, C. X. et al. Outbreak of canine visceral leishmaniasis in Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 47, n. 6, p. 788-90, 2014.

MENDES, C. S. et al. Impacto das mudanças climáticas sobre a leishmaniose no Brasil. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 263-72, 2016.

MENDONÇA, I. L. Protozoários. Teresina. 2017. Apostila de Doenças parasitárias dos animais domésticos. p. 29-35. Disponível em : [https://www.passeidireto.com/arquivo/49113018?utm\\_campaign=ios-arquivo&utm\\_medium=mobile](https://www.passeidireto.com/arquivo/49113018?utm_campaign=ios-arquivo&utm_medium=mobile). Acesso em: 20 dez. 2019.

MENEZES, R. C. et al. Sensitivity and specificity of in-situ hybridization for diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 51, n. 1, p. 206-11, 2013.

MENEZES, R. C. et al. Cell-block Immunohistochemistry of Bone Marrow Aspirates: a Novel Tool to Improve the Diagnosis of *Leishmania* Infection in Dogs. **J. Comp. Pathol.**, v. 154, n. 2-3, p. 157-60, 2016.

MICHALSKY, E. M. et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Vet. Parasitol.**, Amsterdã, v. 147, n. 1-2, p. 67-76, 2007.

MILLER, C. E.; BAIN, B. J. The utility of blood and bone marrow films and trephine biopsy sections in the diagnosis of parasitic infections. **Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.**, Parma, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2015.

MISSAWA, N. A. et al. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 44, n. 1, p. 76-8, 2011.

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

MOLINA, R. et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Oxford, v. 88, n. 4, p. 491-3, 1994.

MOREIRA, M. A. B. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Vet. Parasitol.**, Amsterdã, v. 145, n. 3-4, p. 245-52, 2007.

MULLER, D. C. M. et al. Técnicas e sítios de coleta de medula óssea em cães e gatos. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2243-51, 2009.

MYLONAKIS, M. E. et al. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 34, n. 3, p. 243-7, 2005.

NATHAN, N. A. et al. Cell block cytology: Improved preparation and its efficacy in diagnostic cytology. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 114, n. 4, p. 599-06, 2000.

NEVES, S. M. N.; GUEDES, R. M. C. Hibridização in situ fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 627-32, 2012.

NICOLATO, R. C. et al. Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum* – infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **PLoS One**, São Francisco, v. 8, n. 12, p. 1-9, 2013.

OLIVEIRA, G. G. et al. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Cleveland, v. 85, n. 6, p. 1025-34, 2011.

OPAS: Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas. Washington, **Organização Pan-Americana da Saúde**, 2019. Disponível em: [www.paho.org/leishmaniasis](http://www.paho.org/leishmaniasis). Acesso em: 16 dez. 2019.

ONG, M. G. et al. Maximizing the diagnostic yield from bone marrow aspirate material using the cell block technique on clot sections. **Lab. Med.**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 24-7, 2015.

OSTFELD R. S.; KEESING, F. Effects of Host Diversity on Infectious Disease. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 43, p. 157-82, 2012.

PAIVA, M. B. et al. Cell block of canine buffy coat and bone marrow in paraffin blocks: technique standardization. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 66, n. 2, p. 439-44, 2014.

PALTRINIERI, S. et al. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 45, n. 4, p. 552-78, 2016.

PAPARCONI, R. et al. Sternal aspiration of bone marrow in dogs: a practical approach for canine leishmaniasis diagnosis and monitoring. **J. Vet. Med.**, v. 2013, p. 1-4, 2013.

PAZ, G. F. et al. Implications of the use of serological and molecular methods to detect infection by *Leishmania* spp. in urban pet dogs. **Acta Trop.**, v. 182, p. 198-01, 2018.

PETT, M. A. **Nonparametric statistics for health care research: Statistics for small samples and unusual distributions**. 2<sup>th</sup> ed. Thousand Oaks: SAGE Publications, 2016.

PIMENTEL, M. I. F. et al. High visceral leishmaniasis mortality rate in Barra Mansa, a new area of visceral leishmaniasis transmission in the State of Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 47, n. 4, p. 521-3, 2014.

PINTO, A. J. W.; RIBEIRO, V. M.; TAFURI, W. L. The Immunochromatography use in Canine Visceral Leishmaniasis in Brazil: A “Quick Solution” of a Complex Diagnostic? Rapid Test in Dogs with Leishmaniasis. **Ann. Clin. Cytol. Pathol.**, v. 2, n. 4, p. 1-7, 2016.

QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. **Vet. Parasitol.**, Amsterdã, v. 178, n. 1-2, p. 1-8, 2011.

RAMOS, R. A. N. et al. Polymerase chain reaction and real-time PCR for diagnosing of *Leishmania infantum chagasi* in dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 192-5, 2012.

RAMOS, R. A. N. et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in the bone marrow, lymph node and spleen of dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 22, n. 3, p. 346-50, 2013.

RASKIN, R. E.; MESSIK, J. B. Bone marrow cytologic and histologic biopsies: indications, technique, and evaluation. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, Maryland Heights, v. 42, n. 1, p. 23-42, 2012.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2019. Disponível em <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 16 jan. 2019.

REGINA-SILVA, S. **Análise comparativa de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares na confirmação do diagnóstico em cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral canina**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2009.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res. Vet. Sci.**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

REIS, L. L. et al. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 50, n. 5, p. 638-45, 2017.

REITHINGER, R. et al. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 7, p. 2352-6, 2002.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. et al. A long-term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **Int. J. Parasitol.**, v. 37, n. 6, p. 683-93, 2007.

ROWE, L. R.; MARSHALL, C. J.; BENTZ, J. S. Cell block preparation as an adjunctive diagnostic technique in Thinprep<sup>®</sup> monolayer preparations: A case report. **Diagn. Cytopathol.**, v. 24, n. 2, p. 142-4, 2001.

RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, **Inc.**, Boston, MA, 2019. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>. Acesso em: 16 jan. 2019.

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunol.**, v. 30, n. 10, p. 515-24, 2008.

SANTOS, I. B. et al. Higher sensitivity of Immunohistochemistry for bona fide diagnosis of dog *Leishmania (Viannia) braziliensis* - driven American tegumentary leishmaniasis: description of an optimized immunohistochemistry method. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Londres, v. 109, n. 7, p. 469-76, 2015.

SANTOSH, T. et al. Extensive marrow necrosis due to miliary tuberculosis: A case report. **Ann. Trop. Med. Public Health**, Hayes, v. 8, n. 6, p. 293-5, 2015.

SANTOSH, T. et al. Microfilariae in a bone marrow aspirate. **BMC Res. Notes**, v. 9, p. 1-4, 2016.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Cleveland, v. 73, n. 1, p. 82-6, 2005.

SCHALLIG, H. DFH. Desenvolvimento de um teste rápido de rastreamento da aglutinação (FAST) para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães. **Rev. Parasitol. Vet.**, v. 109, n. 1-2, p. 1-8, 2002.

SCHIMMING, B. C.; SILVA, J. R. C. P. E. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Rev. Cient. Eletron. de Med. Vet.**, Garça, v. 10, n. 19, p. 1-17, 2012.

SCHMITT, F. C. Citologia aspirativa em doenças infecciosas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 30, n. 3, p. 177-9, 1997.

SCHÖNIAN, G., et al. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. **Parasitol.**, v. 138, p. 405-25, 2011.

SCHUBACH, E. Y.; FIGUEIREDO, F. B.; ROMERO, G. A. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Londres, v. 108, n. 9, p. 568-74, 2014.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B. Geographical expansion of canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro state, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 57, n. 5, p. 435-8, 2015.

SILVA, F. **Papel do MHC de classe II na biogênese do vacúolo parasitóforo de *Leishmania amazonensis* e seu impacto no curso da infecção *in vivo***. 2014. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

SILVA, J. N. et al. Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 53, p. 880-4, 2015.

SILVA, R. E. et al. Exploring *Leishmania infantum* cathepsin as a new molecular marker for phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. **BMC Infect. Dis.**, v. 19, n. 895, 2019.

SILVA, S. M. **Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937), submetidos a um protocolo terapêutico em clínica veterinária de Belo Horizonte**. 2007. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Vet. Parasitol.**, Amsterdã, v. 90, n. 1-2, p. 37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasit. Vectors**, v. 4, n. 86, p. 1-16, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Canine and feline leishmaniasis. A brief for the practicing veterinarian. 4<sup>th</sup> ed. February, 2018. Disponível em: [www.leishvet.org](http://www.leishvet.org). Acesso em: 12 dez. 2019.

SOLCÀ, M. S. et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, Amsterdã, v. 184, n. 2-4, p. 133-40, 2012.

SOUZA, C. C. et al. A potential link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 95, n. 4, p. 260-70, 2014.

SOUZA FILHO, J. A. et al. Performance of Alere™ immunochromatographic test for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, Amsterdã, v. 225, p. 114-6, 2016.

SOUZA, M. B. et al. Flebotomíneos de áreas com notificações de casos autóctones de leishmaniose visceral canina e leishmaniose tegumentar americana em Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. entomol.**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 147-50, 2009.

SRIVIDYA, G. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitol. Res.**, v. 110, p. 1065-78, 2012.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 5, p. 951-8, 2002.

SWINGER, R. R.; TUCKER, J. D. Fluorescence *in situ* hybridization: a brief review. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 27, p. 245-54, 1996.

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **J. Immunol. Methods**, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

TAYLOR, B. E. et al. Detection of carcinoma micrometastases in bone marrow of dogs and cats using conventional and cell block cytology. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 42, n. 1, p. 85-91, 2013.

TEIXEIRA, A. I. P. **Cães e tutores: os desafios do diagnóstico e do controle da leishmaniose visceral canina.** 2019. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

THEKISOE, O. M. M. et al. Stability of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) reagents and its amplification efficiency on crude trypanosome DNA templates. **J. Vet. Med. Sci.**, Tóquio, v. 71, n. 4, p. 471-5, 2009.

TLAMCANI, Z. Visceral leishmaniasis: an update of laboratory diagnosis. **Asian Pac. J. Trop. Dis.**, Cingapura, v. 6, n. 7, p. 505-8, 2016.

TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniasis. **Parasitol. Res.**, v. 109, n. 4, p. 1051-7, 2011.

TOZ, S. O. et al. Leishmaniasis in Turkey: molecular characterization of *Leishmania* from human and canine clinical samples. **Trop. Med. Int. Health**, Londres, v. 14, n. 11, p. 1401-6, 2009.

TOZ, S. O. et al. A Real-Time ITS1-PCR Based Method in the Diagnosis and Species Identification of *Leishmania* Parasite from Human and Dog Clinical Samples in Turkey. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, São Francisco, v. 7, n. 5, p. 1-8, 2013.

TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, São Francisco, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2018.

UNIYA, U.; PATLE, Y.; JAIN, H. Comparative study of bone marrow aspiration and bone marrow clot sections in various haematological disorders. **Int. J. Rec. T. Sci. Technol.**, Raipur, v. 19, n. 1, p. 17-20, 2016.

VASCONCELOS, T. C. B. et al. Avaliação da confiabilidade entre dois observadores em exames citopatológico e imunocitoquímico de aspirado de medula óssea no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 68, n. 3, p. 821-4, 2016.

VERÇOSA, B. L. A. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Vet. Res.**, v. 4, n. 45, 2008.

VERMA, S. et al. Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 75, n. 4, p. 390-5, 2013.

WANG, J. Y. et al. The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in western China detected by PCR and serological tests. **Parasit. Vectors**, v. 4, n. 69, p. 1-8, 2011.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, v. 48, n. 5, p. 851-5, 2014.

XAVIER, S. C. et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Vet. Res.**, v. 2, n. 17, 2006.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. **Lancet Infect. Dis.**, v. 4, n. 6, p. 337-48, 2004.

ZANONI, D. S.; GRANDI, F.; ROCHA, N. S. Use of the agarose cell block technique in veterinary diagnostic cytopathology: an "old and forgotten" method. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 41, n. 3, p. 307-8, 2012.

ZOU, L.; CHEN, J.; RUAN, S. Modeling and analyzing the transmission dynamics of visceral leishmaniasis. **Math. Biosci. Eng.**, v. 14, n. 5-6, p. 1585-04, 2017.

ANEXOS:

ANEXO A

	Ministério da Saúde <b>FIOCRUZ</b> Fundação Oswaldo Cruz Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência	
		<b>Comissão de Ética          no Uso de Animais</b>
<b>LICENÇA</b>		<b>LW-54/13</b>
<p>Certificamos que o protocolo (P-40/13-2), intitulado "HIBRIDIZAÇÃO IN SITU NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR <i>Leishmania infantum</i> EM CÃES DOMÉSTICOS", sob a responsabilidade de FABIANO BORGES FIGUEIREDO, 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.</p> <p>Esta licença tem validade até 02/12/2017 e inclui o uso total de :</p>		
<p><i>Canis familiaris</i>          - 75 Machos.          - 75 Fêmeas.</p>		
Rio de Janeiro, 2 de dezembro de 2013		
<p><b>Octavio Augusto França Presgrave</b>          Coordenador da CEUA</p>		
<p><small>Comissão de Ética no Uso de Animais          Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz          Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Marquinhos - Rio de Janeiro / RJ          Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br</small></p>		

## ANEXO B

	Ministério da Saúde <b>FIOCRUZ</b> Fundação Oswaldo Cruz Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência		<b>Comissão de Ética          no Uso de Animais</b>
--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	---------------------------------------------------------

**LICENÇA**

**LW-24/17**

Certificamos que o protocolo (P-51/16-4), intitulado "OCORRÊNCIA DE *Brucella canis* e *Coxiella burnetii* EM CÃES SOROLOGICAMENTE POSITIVOS PARA *Leishmania infantum*", sob a responsabilidade de RODRIGO CALDAS MENEZES, 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 10/07/2021 e inclui o uso total de :

*Canis familiaris*  
 - 90 Machos.  
 - 90 Fêmeas.

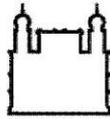
Rio de Janeiro, 10 de julho de

Octavio Augusto França Presgrave  
 Coordenador da CEUA

  
 Etelcia M. Molinaro  
 Vice - Coordenadora  
 CEUA/FIOCRUZ  
 SIAPE 0463096  
 10/07/2017

Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz  
 Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ  
 Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

## ANEXO C



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-Presidência de Pesquisa e  
Coleções Biológicas - VPPCB



**Comissão de Ética  
no Uso de Animais**

---

**TERMO ADITIVO AO CERTIFICADO DA LICENÇA Nº LW-24/17 (P-51/16.4)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Fiocruz, em atenção à solicitação do Dr. Rodrigo Caldas Menezes autoriza o presente aditivo, conforme solicitação do proponente, via e-mail, de 17 de novembro de 2018.

1. Inclusão da coleta de amostras de tecidos nos cães, durante a necropsia: fragmentos de duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon, reto, timo e pâncreas;
2. Inclusão de membros na equipe participante: Renato Orsini Ornellas, Shanna Araujo dos Santos, Amanda Cardozo da Rosa, Lucas Vinícius de Souza Azevedo, Tatiana machado Quintaes Calvet.

Este aditivo tem validade até 10 de julho de 2021.

Rio de Janeiro, 26 de novembro de 2018.

  
Etelcia M. Molinaro

Vice-Coordenadora da CEUA/Fiocruz

