

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Karina Patricia Baracho de Lima

**AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR E SOROLÓGICO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM ANIMAIS DOMÉSTICOS DE
ÁREA ENDÊMICA DE PERNAMBUCO, BRASIL**

RECIFE

2021

KARINA PATRICIA BARACHO DE LIMA

**AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR E SOROLÓGICO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM ANIMAIS DOMÉSTICOS DE ÁREA
ENDÊMICA DE PERNAMBUCO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho

Coorientadora: Dra. Maria Edileuza Felinto de Brito

Recife

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

L732a Lima, Karina Patricia Baracho de.
Avaliação do diagnóstico molecular e sorológico da leishmaniose tegumentar em animais domésticos de área endêmica de Pernambuco, Brasil / Karina Patricia Baracho de Lima. — Recife: [s.n.], 2021.
88 p.: il., graf., tab.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) — Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho;
coorientadora: Maria Edileuza Felinto de Brito.

Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde.

1. Leishmaniose Cutânea - epidemiologia. 2. Leishmaniose Cutânea - diagnóstico. 3. Leishmania braziliensis - isolamento & purificação. 4. Reservatórios de Doenças. 5. Técnicas de Diagnóstico Molecular. 6. Leishmaniose Cutânea - parasitologia. 7. Sorologia. 8. Animais Domésticos. 9. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real - métodos. 10. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática - métodos. I. Brandão Filho, Sinval Pinto. II. Brito, Maria Edileuza Felinto de. III. Título.

CDU 595.771

KARINA PATRICIA BARACHO DE LIMA

**AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR E SOROLÓGICO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM ANIMAIS DOMÉSTICOS DE
ÁREA ENDÊMICA DE PERNAMBUCO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 25 de junho de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sinval Pinto Brandão Filho

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Valéria Pereira Hernandes

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Luciana Aguiar Figueredo

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho aos meu amados avós que já não se encontram mais neste plano, a minha mãe por ser minha base e meu primeiro exemplo de educadora e ao meu pai pelo amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais por todo amor e confiança. Onde renunciaram a tantas conquistas próprias pra dar a mim e meu irmão a melhor educação possível. Aos meus familiares, especialmente ao meu irmão Danilo e minha cunhada Juliana que nunca negaram ajuda quando eu precisei, em qualquer aspecto, sem esquecer da minha amável e linda sobrinha Lorena.

A Wellyson Gonçalves, companheiro e amigo, que jamais conseguirei expressar a enorme gratidão pelo apoio incondicional, pela confiança, cuidado, paciência e respeito. Amo você. Aos meus sogros por todo apoio e ao meu sobrinho do coração Wesley Junior.

Aos colegas de turma da graduação e mestrado, em especial Carol, Victor, Cicinho, Adri, Bruno, Helena e Maiara. Obrigado pelos estudos em grupo, apoio e risadas.

A minha coorientadora Dra Maria Edileuza F. de Brito pelos conselhos, críticas, amizade e apoio nestes anos. Muito mais que uma orientadora, uma amiga, uma fada madrinha. Só tenho a agradecer a excelente profissional que tive a honra de conhecer e pretendo levar como exemplo para o resto da vida. Me torno mestra principalmente devido ao seu incentivo.

A Dra Juliana Figueirêdo, sempre gentil e atenciosa, nunca mediu esforços para me ajudar, gratidão eterna. Ao acolhimento de todos os colegas do departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães, em especial a Allana, Samara, Stephane, Rosineide pelas orações e palavras de conforto. Agradeço a Rafaela Lira pela amizade, cafés, conversas e risadas.

Aos técnicos Andrea e Erika do Serviço de Referência em Leishmaniose do IAM por serem sempre disponíveis. Desculpem os pedidos frequentes. Ao Instituto Aggeu Magalhães FIOCRUZ- PE e toda a estrutura disponibilizada e contribuição para o meu crescimento profissional na área em que desejei seguir. Em especial ao meu orientador diretor Dr. Sival Pinto Brandão filho pelo acolhimento na equipe e apoio nestes anos.

A todos os meus professores que grandemente contribuíram para o meu crescimento neste trabalho árduo de educar. Estou me formando mestra na área que desejo e gostaria de deixar claro meu posicionamento sempre a favor da ciência e educação. Não foi fácil uma formação na pandemia mas serviu pra reafirmar as verdades que jurei cumprir em meu juramento como bióloga. Dedico este projeto às vítimas do descaso no Brasil. Obrigado por ter passado pela minha vida Fran, pra sempre lembrarei de você. FB!

RESUMO

LIMA, Karina Patricia Baracho de. **Avaliação do diagnóstico molecular e sorológico da leishmaniose tegumentar em animais domésticos de área endêmica de Pernambuco, Brasil.** 2021. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

Em Pernambuco, o município de Moreno localizado na região metropolitana de Recife, a leishmaniose tegumentar (LT) destaca-se por apresentar importante incidência com uma média de 52 casos registrados ao ano. A LT possui hospedeiros e reservatórios naturais da doença que já foram descritos em áreas endêmicas de várias regiões do Brasil como: cães (*Canis familiaris*), gatos domésticos (*Felis catus*); cavalos (*Equus caballus*) e jumentos (*Equus asinus*). Na região Nordeste diversos aspectos relacionados a ecoepidemiologia da doença na Zona da Mata de Pernambuco já foram caracterizados, sendo a espécie predominantemente é a *L. (Viannia) braziliensis*. O diagnóstico da doença necessita de contexto epidemiológico, clínico e confirmação laboratorial. Esse estudo teve como objetivo avaliar a potencial infecção de *L. braziliensis* em animais domésticos através de testes sorológicos e moleculares em área endêmica de Recife. Foram coletadas amostras de 272 animais residentes no entorno de domicílios com casos clínicos humanos confirmados. As amostras foram obtidas por conveniência através da coleta de sangue e secreção da conjuntiva (método não invasivo), e 237 submetidas aos ensaios imunológico (ELISA) e moleculares (PCR convencional e PCR em tempo real). Os resultados obtidos demonstraram que a concordância entre PCR e qPCR dos leucócitos foi significativa com $p=0,001$, e o ELISA dos cães, cinco animais foram positivos, confirmando que mesmo animais sem lesão aparente podem apresentar DNA de *Leishmania*. Os dados obtidos adicionam informações relevantes ao papel dos animais domésticos e peridomésticos no ciclo epidemiológico da leishmaniose tegumentar.

Palavras-chave: leishmaniose tegumentar; epidemiologia; reservatórios; molecular; sorologia.

ABSTRACT

LIMA, Karina Patricia Baracho de. **Serological and molecular evaluation of asymptomatic domestic animals for cutaneous leishmaniasis.** 2021. Dissertation (Academic Master's in Bioscience and Biotechnology at Health) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

In Moreno, Metropolitan Region of Recife, Pernambuco, the cutaneous leishmaniasis (LT) is highlighted for exhibiting important incidence, with a mean number of 52 cases of the disease registered yearly. The disease is associated with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, main etiological agent from LTA in the state, connected to the identification of reservoir hosts and several species of varmint phlebotomine. Are considered LTA reservoirs the species of animals that maintain the circulation of *Leishmania* spp. in nature. Cases of natural infection by *L. (V.) braziliensis* are described in endemic areas in different regions of Brazil, dogs (*Canis familiaris*), domestic cats (*Felis catus*), horses (*Equus caballus*), donkeys (*Equus asinus*). The objective of this study is to perform the serological and molecular evaluation of asymptomatic domestic animals for LTA in the metropolitan region of Recife. 272 samples were collected from animals (canine, feline, equine and swine) residing around confirmed human clinical cases of LTA. The samples were obtained by convenience through blood collection and conjunctiva secretion (non invasive method), and 237 submitted to the immunological (ELISA) and molecular (conventional PCR and qPCR). The results obtained demonstrated that the agreement between leukocyte PCR and qPCR was significant with $p = 0.001$ and the ELISA of dogs only five positive animals, confirming that even animals with no apparent lesion can present *Leishmania* parasitic DNA. The collected data add relevant information to the role of domestic and peridomestic animals in the epidemiological cycle of tegumentary leishmaniasis.

Keywords: cutaneous leishmaniasis; epidemiology; reservoir; molecular; serology.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Ciclo evolutivo das leishmanioses..... | 21 |
| Figura 2 - Status de endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo..... | 22 |
| Figura 3 - Lesões características da leishmaniose tegumentar em animais domésticos..... | 24 |
| Figura 4 - Coleta de <i>swab</i> conjuntival e sangue de cães..... | 26 |
| Figura 5 - Longos maxicírculos indicados por seta conectando duas redes formadas por minicírculos (Borst&Hoeijmakers, 1979) | 33 |
| Figura 6 - Mapa do município de Moreno localizado na região metropolitana do Recife.... | 38 |
| Figura 7 - Imagem ilustrativa da separação leucócitos e plasma sanguíneo..... | 40 |
| Figura 8 - Fluxo demonstrativo de obtenção das amostras à realização dos testes..... | 46 |
| Figura 9 -Curva de diluição de DNA genômico de <i>L (V.) braziliensis</i> na PCR convencional..... | 47 |
| Figura 10 - Curva de diluição para <i>L (V.) braziliensis</i> na qPCR com eficiência de 98% | 47 |
| Figura 11 -Curva de <i>melting</i> com uma amostra positiva para <i>L (V.) braziliensis</i> | 48 |
| Figura 12 -Amplificação de DNA de <i>L (V.) braziliensis</i> em leucócitos por qPCR..... | 48 |
| Figura 13 -Amplificação de DNA de <i>L (V.) braziliensis</i> em <i>swab</i> conjuntival por qPCR..... | 49 |
| Figura 14 -Amplificação de DNA de <i>L (V.) braziliensis</i> em gel de agarose..... | 50 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Resultados da qPCR em amostras de leucócitos de animais domésticos por espécie..... | 49 |
| Tabela 2 - Resultados da qPCR utilizando amostras de <i>swab</i> de conjuntiva de animais domésticos por espécie..... | 49 |
| Tabela 3 - Tabela dos animais por espécie (%) em leucócitos na PCR convencional..... | 51 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1 - Sintomas sugestivos de leishmaniose tegumentar nos animais domésticos..... | 45 |
| Gráfico 2 - Detecção de <i>L. (Viannia) braziliensis</i> em <i>Canis familiaris</i> | 51 |
| Gráfico 3 - Detecção de <i>L. braziliensis</i> em <i>Felis catus</i> | 52 |
| Gráfico 4 - Detecção de <i>L. braziliensis</i> em <i>Equus caballus/ Equus asinus</i> | 52 |
| Gráfico 5 - Detecção de <i>L. braziliensis</i> em <i>Capra hircus</i> | 53 |
| Gráfico 6 - Concentração média de DNA por espécie em leucócitos | 54 |
| Gráfico 7 - Concentração média de DNA por espécie em <i>swab</i> conjuntival..... | 54 |
| Gráfico 8 - Prevalência para infecção por <i>L. braziliensis</i> em <i>Canis familiaris</i> | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CEUA** – Comissão Interna no Uso de Animais
- DNA** - Ácido Desoxirribonucleico
- ELISA** - *Enzyme linked immunosorbent assay*
- FIOCRUZ** - Fundação Oswaldo Cruz
- HIV** - Vírus da imunodeficiência humana
- IAM** - Instituto Aggeu Magalhães
- IDRM** - Intradermoreação de Montenegro
- LC** - Leishmaniose cutânea
- LCL** - Leishmaniose cutânea localizada
- LD** - Leishmaniose difusa
- LM** - Leishmaniose Mucosamucosa
- LT** - Leishmaniose tegumentarAmericana
- LV** – Leishmaniose visceral
- MS** – Ministério da Saúde
- NNN** – Novy, McNeal modificado por Nicolle
- PCR** - Reação em cadeia da polimerase
- PD** - Pesquisa direta
- qPCR** - PCR em tempo real
- RIFI** - Reação de imunofluorescência indireta
- WB** - *Western blotting*

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 2.1 <i>Principais características das leishmanioses</i> | 19 |
| 2.1.1 Ciclo evolutivo | 20 |
| 2.2 <i>Aspectos gerais da leishmaniose tegumentar (LT)</i> | 21 |
| 2.2.1 Hospedeiros reservatórios envolvidos na LT..... | 23 |
| 2.2.2 Animais assintomáticos | 24 |
| 2.2.3 Métodos de coleta e amostras utilizadas no diagnóstico da LT..... | 25 |
| 2.3 <i>Diagnóstico da LT</i> | 27 |
| 2.3.1 Diagnóstico imunológico..... | 28 |
| 2.3.2 Diagnóstico molecular..... | 29 |
| 2.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)..... | 29 |
| 2.3.4 PCR em tempo real (qPCR)..... | 30 |
| 2.3.5 Limitações dos testes moleculares..... | 31 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 34 |
| 4 PERGUNTA CONDUTORA | 35 |
| 5 HIPÓTESE | 36 |
| 6 OBJETIVOS | 37 |
| 6.1 GERAL..... | 37 |
| 6.2 ESPECÍFICOS | 37 |
| 7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS | 38 |
| 7.1 <i>Área de estudo</i> | 38 |
| 7.2 <i>Identificação dos animais</i> | 38 |
| 7.3 <i>Aspectos éticos</i> | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 7.4 Animais..... | 39 |
| 7.5 Definição de assintomáticos, sintomáticos e oligosintomáticos..... | 39 |
| 7.6 Critério de inclusão..... | 39 |
| 7.7 Critério de exclusão..... | 40 |
| 7.8 Obtenção do anel leucocitário e separação do plasma..... | 40 |
| 7.9 Abordagem molecular..... | 41 |
| 7.9.1 Extração de DNA..... | 41 |
| 7.9.2 PCR em tempo real (qPCR)..... | 41 |
| 7.9.3 Curva de diluição..... | 42 |
| 7.9.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR convencional)..... | 42 |
| 7.9.5 Análise dos produtos de PCR..... | 42 |
| 7.10 Abordagem imunológica..... | 42 |
| 7.10.1 Obtenção das formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> | 42 |
| 7.10.2 Antígenos de <i>L. (V.) braziliensis</i> para teste de ELISA..... | 43 |
| 7.10.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)..... | 43 |
| 7.11 Análise estatística..... | 44 |
| 8 RESULTADOS..... | 45 |
| 8.1 Curva de diluição de DNA genômico de <i>L. (V.) braziliensis</i> | 47 |
| 8.2 PCR em tempo real..... | 48 |
| 8.2.1 Leucócitos..... | 48 |
| 8.3 PCR convencional..... | 50 |
| 8.3.1 Leucócitos..... | 50 |
| 8.4 Identificação de <i>L. (V.) braziliensis</i> nos testes moleculares por espécie..... | 51 |
| 8.4.1 <i>Canis familiaris</i> | 51 |
| 8.4.2 <i>Felis catus</i> | 52 |
| 8.4.3 <i>Equus caballus</i> / <i>Equus asinus</i> | 53 |
| 8.4.4 <i>Capra hircus</i> | 53 |
| 8.5 Quantidade de média de DNA de <i>L. (V.) braziliensis</i> nos animais..... | 53 |
| 8.6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)..... | 55 |
| 8.7 Teste de concordância KAPPA..... | 55 |
| 9 DISCUSSÃO..... | 56 |

| | |
|---|----|
| 10 CONCLUSÃO | 62 |
| REFERÊNCIAS | 63 |
| APÊNDICE 01 – Ficha de Identificação de Cães | 74 |
| APÊNDICE 02 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido..... | 75 |
| 12 ARTIGO – Identificação de <i>L (V.) braziliensis</i> em animais domésticos e peridomésticos assintomáticos no Nordeste do Brasil..... | 76 |
| ANEXO 01 – CEUA..... | 86 |
| ANEXO 02 – Carta de Anuência..... | 87 |

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são enfermidades de grande importância para saúde pública mundial. São transmitidas pela picada das fêmeas infectadas de diversas espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* durante o repasto sanguíneo (SHAW; LAINSON, 1987). Compreendem um espectro de doenças que se diferenciam dependendo dos locais de ocorrência em função das variáveis relacionadas aos parasitos, vetores, reservatórios, ecossistemas, entre outros (SCHWARTZ, HATZ, BLUM, 2006).

A leishmaniose tegumentar (LT) é caracterizada por sua forma cutânea podendo atingir também a mucosa. É endêmica junto com a LV em 98 países, entretanto quase 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem no estado plurinacional da Bolívia, Brasil e Peru (ALVAR et al., 2012; WHO, 2016). No Brasil a LT possui padrões de transmissão onde se observa uma diversidade de vetores, reservatório e hospedeiros (BRILHANTE, 2016; GOMES et al., 2017).

No nordeste o estado de Pernambuco possui áreas endêmicas para LT localizadas na capital (Recife) e Zona da Mata (Norte e Sul) (RAMOS, 2011). Podendo haver subnotificação de casos humanos em regiões rurais e diagnósticos tardios (TEMPONI et al., 2018). Estudos relatam que a LT foi identificada em animais domésticos, como cães, considerados hospedeiros acidentais podendo participar da manutenção do ciclo (BRASIL, 2017).

Nas manifestações em humanos as formas clínicas podem se apresentar desde inaparentes até ulcerações múltiplas (COUTINHO et al., 1987; COSTA et al., 1992; PASSOS et al., 2013). Nos animais, a manifestação clínica é dependente de diversos fatores, muitas vezes não apresentando sintomas, sendo a severidade dos sinais clínicos estritamente relacionada ao grau de infecção de cada animal (SEBOLT et., 2018; DANTAS-TORRES., 2012).

Os métodos disponíveis para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar em diferentes espécies devem ser sequencialmente organizados de acordo com procedimentos, histórico do caso, avaliação clínica e achados laboratoriais específicos (parasitológico, imunológico e molecular) (BRITO et al., 2012). A utilização de técnica sorológica e molecular visa identificar o contato dos animais com o parasito, sendo importantes no estabelecimento da infecção.

O presente estudo propõe avaliar a potencial infecção de LT nos animais domésticos assintomáticos, a fim de contribuir para o conhecimento de potenciais reservatórios da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Principais características das leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas por flebotomíneos do gênero *Lutzomya* através da picada das fêmeas infectadas e hospedado por uma variedade de reservatórios e hospedeiros (OMS 2019).

A leishmaniose visceral (LV) cujo agente etiológico é *Leishmania (Leishmania) infantum*, é uma doença zoonótica e está presente em 26 estados das cinco regiões do Brasil (BRASIL, 2017). Se não tratada a taxa de mortalidade nos países em desenvolvimento pode chegar a 100% em 2 anos (WHO 2019). Em sua forma cutânea conhecida como leishmaniose tegumentar (LT) há uma taxa de letalidade menor que a LV, entretanto, pode causar lesões mutilantes na mucosa de lábios, palato, nariz e orelha (CAMARGO et al., 2003; COSTA et al., 2009).

Espécies causadoras da LV e LT pertencem ao subgênero *Leishmania* e *Viannia* e têm importância médica no novo mundo como agente etiológico. No Brasil a leishmaniose visceral é causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum* e a leishmaniose tegumentar por sete espécies do subgênero *Viannia*: *Leishmania (Viania) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) shawi*, *L.(V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindendergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (BRASIL, 2017).

Os vetores da doença são os flebótomos, que são pequenos insetos de grande relevância médica e veterinária devido a transmissão das leishmanioses. A fauna flebotomínica é composta por mais de 230 espécies e seu estudo fornece informações importantes para saúde pública (DANTAS-TORRES et al., 2010). Seu habitat normalmente são áreas de floresta caracterizadas por pouca luz e alta umidade. Devido a diversas mudanças ambientais ocasionadas por ação antrópica os vetores passaram a ser frequentemente observados também em área urbana (ALVES et al., 2019).

A diferença morfológica na alimentação entre machos e fêmeas de flebotomíneos é fator determinante para transmissão e baseia-se na mandíbula, onde no macho é rudimentar não sendo capaz de penetrar em vertebrados, além disto nutrem-se de matéria vegetal (fitófagos); já as fêmeas realizam hematofagia, pois o sangue é utilizado para a maturação dos ovos, os quais são depositados preferencialmente em solo com matéria orgânica em decomposição (BASTOS et al., 2016).

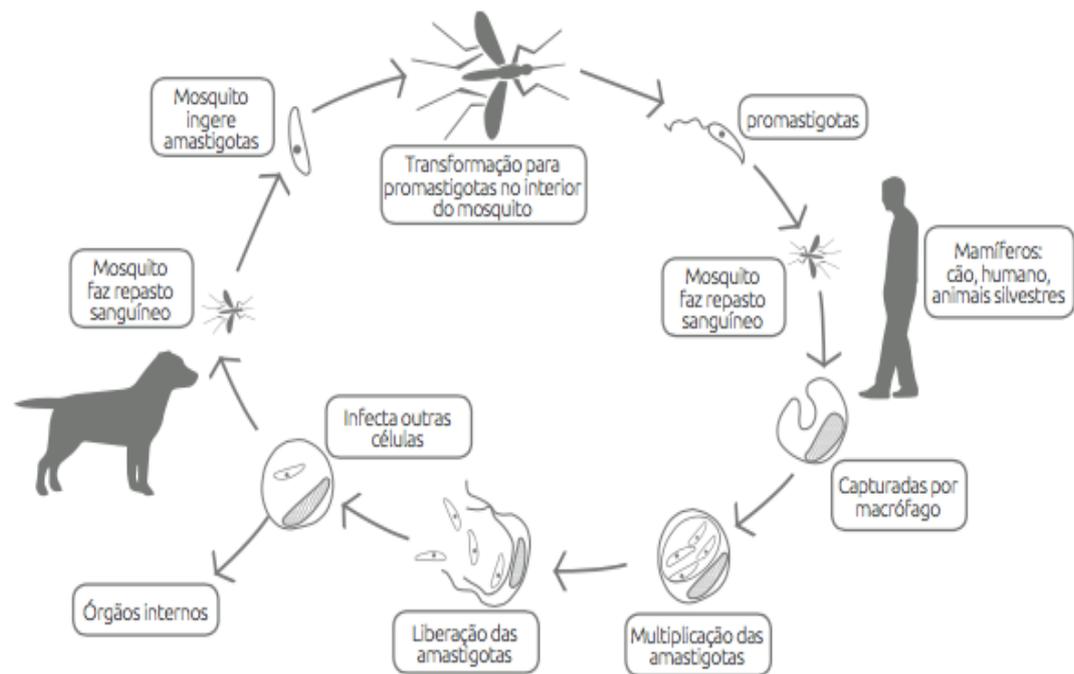
No novo mundo os flebótomos estão divididos em três gêneros: *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileyia* sendo predominantes espécies do gênero *Lutzomyia*. Essas apresentam características biológicas diferentes do gênero *Phlebotomus*, sendo este predominante no velho mundo (ALEXANDER & YOUNG, 1992; DESJEUX, 2004).

As principais espécies envolvidas na transmissão das leishmanioses no Brasil são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei* e *Lu. migonei*, *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi* (DANTAS-TORRES et al., 2010; SHIMABUKURO et al., 2011).

2.1.1 Ciclo Evolutivo

Em seu ciclo de vida os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam forma evolutiva flagelada e extracelular (promastigota) e a aflagelada e intracelular (amastigota). A forma promastigota é inoculada pela fêmea no repasto sanguíneo e endocitado por macrófagos da pele ou vísceras, formam o vacúolo parasitóforo e se reproduzem por divisão binária (REY, 2010).

Quando o vetor faz o repasto sanguíneo no indivíduo ou animal parasitado a forma amastigota passa a evoluir no interior de seu tubo digestivo. Tornam-se então alongadas e seus flagelos crescem, os parasitos passa a promastigotas retornando ao ciclo (Figura 1.) (NEVES, 2016).

Figura 01. Ciclo evolutivo das leishmanioses

Fonte: vetsmart 2016

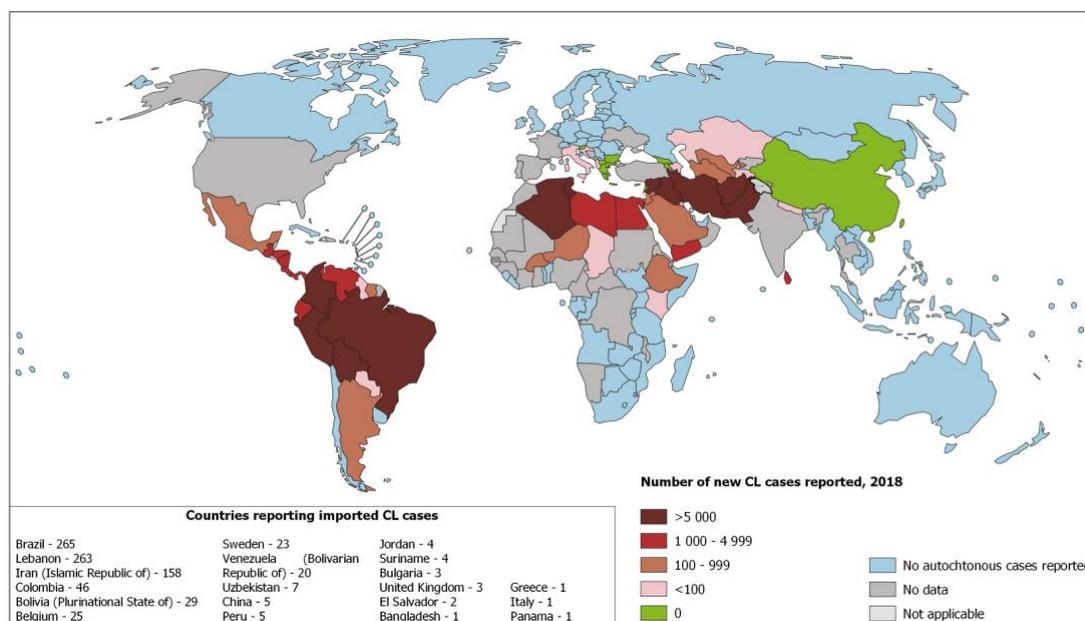
2.2 Aspectos gerais da Leishmaniose Tegumentar (LT)

Trata-se de uma doença que acompanha o homem desde tempos remotos, relatos da LT foram descritos no primeiro século d.C. na Ásia Central. Cunnigham, em 1885 fez a primeira observação do parasito do gênero *Leishmania* (FURTADO,1994). Na cidade de Bauru em São Paulo durante a construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil houveram casos da doença, onde se originou a denominação úlcera de Bauru (NEVES et al., 2016). Gaspar Vianna, em 1911, nominou como *Leishmania braziliensis* e introduziu o tártaro emético como terapia em 1912, utilizada por muito tempo como a única droga no tratamento da LT (COSTA et al.,2009).

Junto com a LV É uma doença endêmica em 98 países, três territórios e cinco continentes, e que afeta 12 milhões de pessoas no mundo e outras 350 milhões estão sob risco de infecção (Figura 2). Um terço dos casos ocorrem nas América e o Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru são os dez países com mais casos e juntos são responsáveis de 70% a 75% da incidência global estimada (COSTA et al.,2009; ALVAR et al., 2012).

Nas Américas, o Brasil é considerado o país de maior prevalência deste agravo, é uma doença de notificação compulsória do Ministério da Saúde (MS), com registros em todas as unidades federativas (BRASIL., 2017). Na região Nordeste do Brasil, mais de 60% dos casos ocorrem na Zona da Mata de Pernambuco a espécie predominante é a *Leishmania braziliensis* que acomete principalmente adultos do sexo masculino devido à atividade laboral geralmente próximo a região de mata (BRANDÃO-FILHO et al.,2003 a; BRITO et al., 2009;2012;2018)

Figura 02. Status de endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo



Fonte: World Health Organization, 2018.

É característica da espécie *L. braziliensis* apresentar poucos parasitos nas lesões, e as principais manifestações clínicas da LT são lesões na pele e mucosa a partir da inoculação das formas promastigotas nesta região pela fêmea do flebotomíneo (BRITO et al., 2012). As expressões da doença em humanos podem variar de localizadas, cutânea disseminada, difusa e mucosa. A depender da forma clínica apresentada, a doença poderá evoluir para maior gravidade ou cura espontânea (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A forma cutânea localizada (LCL) ocorre com maior frequência e apresenta bordas das lesões elevadas e endurecidas, com tamanho variável de 1 a 10 mm de diâmetro demonstrando um tecido granulomatoso ao fundo com regiões esbranquiçadas e periféricas rosa (TORRES-GUERRERO et al., 2017). A cutânea disseminada se caracteriza por apresentar lesões papulares do tipo acneiforme distribuídas por várias regiões do corpo

(COSTA et al., 2009). Há ainda recidiva cútis com desenvolvimento de lesões satélites próximas a cicatriz, após tratamento (MENDONÇA et al., 2004; GOTO et al., 2010).

Uma forma menos comum é a leishmaniose Difusa (LD), que se caracteriza por ser anérgica ou seja, não há resposta imune ao antígeno parasitário (COSTA et al., 2009). Dentre as configurações descritas a mais severa é a leishmaniose mucosa (LM), sendo de difícil tratamento podendo levar a morte do indivíduo. O parasita possui a capacidade de migrar para tecidos mucosos por vias linfáticas ou hematogênica apresentando deformidades nasal que leva a ulcerações no septo e oral (lábios e bochechas) caracterizando a forma mucosa grave (REITHINGER et al., 2007).

2.2.1 Hospedeiros Reservatórios envolvidos na LT

Por definição, hospedeiro é: “ser vivo que em circunstâncias naturais, permite a subsistência e o alojamento de um agente infeccioso”. E reservatório é “qualquer ser humano, animal, artrópode, planta, solo ou matéria inanimada, onde normalmente vive e se multiplica um agente infeccioso e do qual depende para sua sobrevivência, reproduzindo-se de forma que possa ser transmitido a um hospedeiro suscetível” (OPAS., 2011).

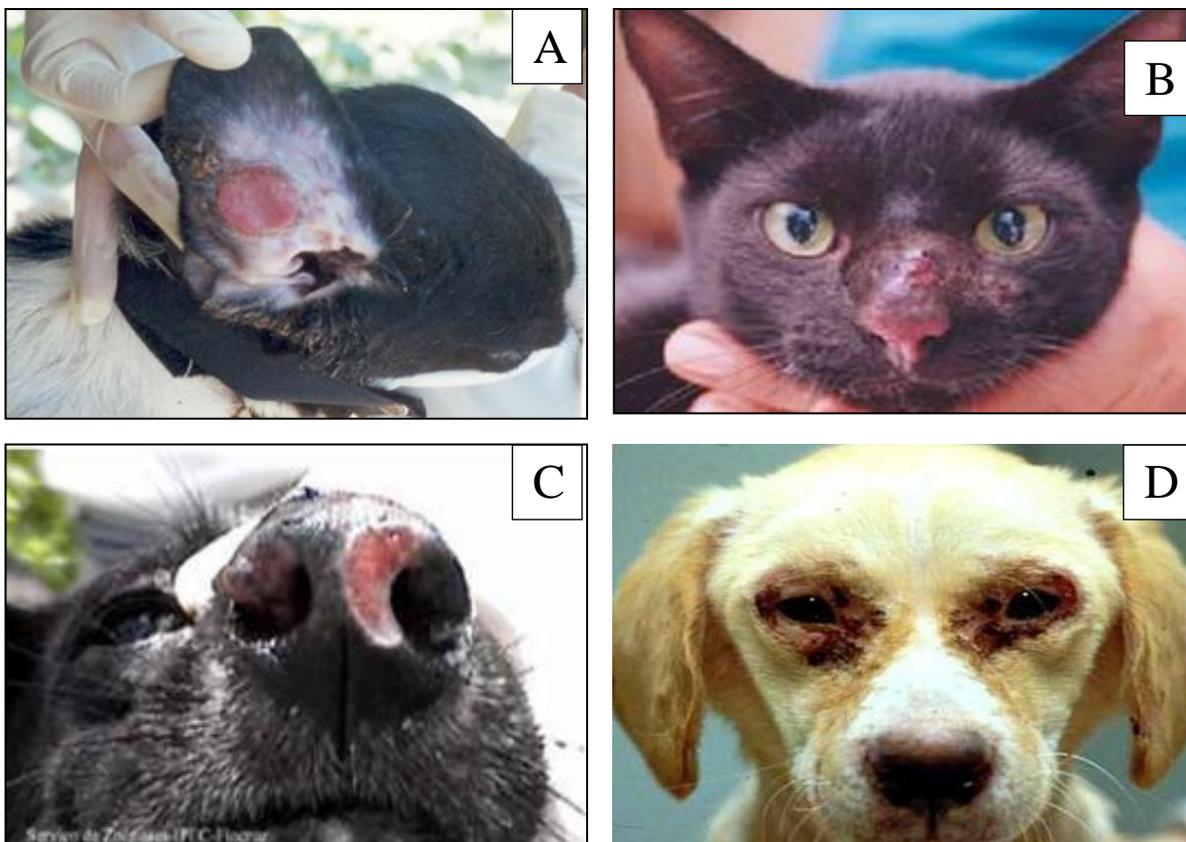
A infecção pelo gênero *Leishmania* foi descrita em animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos, equídeos). Já foram registrados como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais espécies de roedores como: *Necomys* (syn. *Bolomys*) *lasiurus*, *Rattus rattus* e *Necomys squamipes* (BRANDÃO-FILHO et al., 2003a).

Dentre os reservatórios há os animais domésticos e peridomésticos, que são aqueles que vivem em estreita dependência com o ser humano ou ao redor das casas. Esses podem ser susceptíveis à infecção por protozoários, a exemplo do gênero *Leishmania* (DE CASTRO, 2009; BARBOSA et al., 2010).

Animais como cães (*Canis familiaris*) (MADEIRA et al., 2006; TOLEZANO et al., 2007), gatos domésticos (*Felis catus*) (SAVANI et al., 2004; DANTAS-TORRES et al., 2006) equinos (*Equus caballus* e *Equus asinus*), pequenos roedores silvestres e sinantrópicos (YOSHIDA et al., 1990; BRANDÃO-FILHO et al., 2003; LIMA et al. 2013) e primatas não humanos (LAINSON; SHAW, 1989; SHAW et al., 1991) podem participar da manutenção do ciclo de transmissão da LT. Estudos relatam que animais domésticos podem ser infectados, entretanto, podendo apresentar ou não sintomas (PIRAJÁ et al, 2013; PASSOS, 2013).

Figura 03. Lesões características da Leishmaniose Tegumentar em animais domésticos.

A: Orelha de felino, B: Lesão em focinho de felino, C e D: Lesão em focinho de cão.



Fonte: A/B/C: Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar 2017, Fonte D: Colégio Web.

2.2.2 Animais Assintomáticos

Dentre os animais domésticos os cães são os mais relatados devido a seu contato direto com os humanos. Podem desempenhar o papel de reservatório, quando assintomáticos, e atuar como fonte de infecção para flebotomíneos em ambientes domésticos e peridomésticos (DANTAS-TORRES et al., 2007). Estudo realizado por ZANZARINI et al., (2005) demonstraram que de 53 cães que não apresentavam lesão, 25 (47,2%) tiveram a Imunofluorescência Indireta (IFI) positiva para LT, isto é, animais soropositivos e sem sintomatologia clínica.

Animais de outras espécies também podem apresentar caráter não sintomatológico, como em estudo com felinos realizado por FIGUEIREDO et al., (2009), onde demonstraram que no município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, considerada área não endêmica foi realizado inquérito sorológico em 43 gatos assintomáticos para LT. Nenhum foi reagente à RIFI, porém ao ELISA, 2,4% apresentaram sororreatividade e 4,8% resultados

indeterminado. Estudos realizados no mesmo estado, entretanto em área endêmica, houve aumento da soro prevalência (25%) de *Leishmania* spp. em gatos domésticos assintomáticos (DA SILVA et al., 2008).

Nas Américas, os principais reservatórios de *Leishmania* dentre os mamíferos são os animais silvestres como roedores, gambás, os domésticos e peridomésticos como caninos, primatas e equinos. Entretanto, nos últimos anos, ocorrem discussões sobre o papel dos felinos (gato doméstico) como hospedeiro de *Leishmania*, devido à verificação do aumento de infectados nos últimos anos (DUARTE et al., 2010).

No Brasil, o papel dos equinos no ciclo de transmissão da LT ainda não foi definitivamente esclarecido (BRASIL, 2010). Entretanto, a presença de equinos em área endêmica observa-se a alta prevalência da infecção e parece implicar que estes animais participam da cadeia de transmissão em ambientes peridomiciliares (MADEIRA et al., 2003; SANTOS et al., 2005). Na Venezuela os equinos são considerados reservatórios doméstico de *L. braziliensis* (AGUILAR et al., 1984; BARBOSA et al., 2010)

A associação de técnicas sorológicas e moleculares tem auxiliado na demonstração de animais assintomáticos positivos para leishmanioses em diferentes áreas endêmicas, demonstrando o potencial de infecção desses animais que atuam como reservatórios (GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

2.2.3 Métodos de coleta e amostras utilizadas no diagnóstico da LT

As principais amostras utilizadas para o diagnóstico da LT são realizadas com auxílio de punch de 5mm e lâmina de bisturi que pode ser utilizada para confecção de esfregaços em lâmina, cortes histológicos, inoculações em animais ou em meios de cultura, punção aspirativa e escarificação (SIRIYASATIEN et al., 2016).

A punção aspirativa é realizada através da inoculação de soro fisiológico estéril na borda da lesão ou linfonodo, utilizando-se uma seringa de 5ml e agulha de 25x8G seguida de aspiração. A escarificação é feita na borda interna da úlcera ou da superfície de lesão fechada, utilizando-se lâminas de bisturi ou estilete estéreis (BRASIL, 2010). Para os exames imunológicos e sorológicos é utilizado o sangue que também é destinado ao desenvolvimento de testes moleculares (BRASIL, 2007).

Métodos alternativos para coleta são estudados com o objetivo de proporcionar maior conforto ao animal. Na literatura já foram descritas diversas amostras como esfregaços de secreções nasais e orais (GOMES et al., 2014), saliva humana, (BRITO et al 2018; CORVALAN et al., 2011) e secreção ocular (Figura 04) (BARBOSA et al., 2012) como possíveis a detecção de *Leishmania* spp. (VALENCIA et al., 2012).

Figura 04. Coleta de *swab* conjuntival e sangue de cães



Fonte E: Azevedo et al 2009, **Fonte F:** Hamilton Rocha 2017

2.3 Diagnóstico da LT

O diagnóstico da LT tanto em humanos quanto animais é baseado em características clínicas através da anamnese das lesões observadas (se houver lesão), dados epidemiológicos e o diagnóstico complementar através dos testes laboratoriais (COSTA et al., 2009). O diagnóstico nos animais pode ser feito por métodos diretos ou indireto. Os métodos diretos baseiam-se na observação do parasita em esfregaços (QUEIROZ et al., 2010; LIMA et al., 2013) ou indiretos, como a imunofluorescência indireta e ELISA.

A resposta clínica nos hospedeiros mamíferos é determinada por uma complexa interação entre vetor, espécie de *Leishmania* e resposta imunológica do hospedeiro. As formas da LT apresentam polos responsivos e não responsivos, por não apresentar resposta imune ao antígeno do parasito. Este vasto polimorfismo das manifestações clínicas dificulta sua confirmação (ANDRADE et al., 2008).

Para o diagnóstico mais preciso é indicado descartar outras doenças que possuem semelhanças clínicas com a LT através do diagnóstico diferencial (COSTA et al., 2009). A leishmaniose nos animais deve ser incluída no diagnóstico diferencial de qualquer enfermidade que apresente lesões especialmente na região da cabeça e orelhas e que não respondam ao tratamento antibacteriano e antifúngico (RAMOS-VARA et al., 1996).

Devido ao espectro das apresentações clínicas, o diagnóstico clínico-epidemiológico deve ser complementado, sempre que possível, por métodos laboratoriais.

O exame direto com a visualização do parasito em amostras clínicas é o teste diagnóstico padrão ouro (*Gold Standard*), o primeiro teste que deve ser avaliado para LT em humanos no Brasil de acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2017). De acordo com o Manual técnico – leishmaniose canina quando o animal apresenta lesão, comumente são realizados o histopatológico de biópsias das lesões cutâneas, punção e citologia aspirativa corados com Giemsa, Wright, Leishman ou Feulgen, para observação das formas amastigotas (CMRV., 2015).

O isolamento em meio de cultura é considerado o método mais específico no diagnóstico, é utilizado o ágar-sangue de Novy, McNeal e Nicole (NNN). O parasito cresce adequadamente em temperatura ambiente (24° a 26°C) e a sensibilidade da técnica para *L. braziliensis* está em torno de 50% (FREEMAN, 1983). A inoculação preferencialmente em hamsters (*Mesocricetus auratus*) por material de biópsia cutânea é outra forma de diagnóstico parasitológico. Ambos necessitam de pessoal treinado e requer tempo para o resultado (FURTADO, 1980).

2.3.1 Diagnóstico imunológico

Entre os métodos imunológicos usados para o diagnóstico das leishmanioses incluem-se Intradermorreação de Montenegro (IDRM) e testes sorológicos. A IDRM detecta uma hipersensibilidade tardia através da resposta celular de 48 a 72 horas após inoculação de antígenos de *Leishmania* spp. na derme (MONTENEGRO, 1926).

A sensibilidade da técnica varia entre 86% a 100%, entretanto devido à realização de um coquetel de antígenos há uma diminuição considerável da especificidade por reações cruzada. Neste método a positividade é observadas somente após 4 meses da infecção e não há distinção de infecções presente e passadas. Ocorre negatividade da forma difusa em pacientes imunossuprimidos (ANDRADE et al., 2008).

O método de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é um método sorológico utilizado para humanos e animais, tem uma sensibilidade mais elevada para o diagnóstico de LT do que os testes parasitológicos (SOUZA et al., 2013). Além do ELISA a imunofluorescência indireta (IFI) e *Western blot* são os mais citados em trabalhos científicos, e apresentam sensibilidade que variam entre 70 - 90%, sendo o terceiro de até 100% (BRITO et al., 2000; CERUTTI et al., 2017).

Um dos fatores a serem considerados nesses métodos é a reatividade cruzada, no caso da leishmaniose pode haver com protozoários da família Trypanosomatidae, como o *T. cruzi* causador da doença de chagas o que diminui a especificidade do teste (BRITO et al., 2000; LUCIANO et al., 2009). Os antígenos têm sido estudados para o aumento da sensibilidade e diminuição da reação cruzada (DUARTE et al., 2015). O

acompanhamento dos títulos de IgM e IgG é realizado para observação da cura clínica (BRITO et al., 2001; FAGUNDES-SILVA et al., 2015).

2.3.2 Diagnóstico Molecular

Métodos moleculares são amplamente utilizados na detecção de DNA do parasito mesmo quando há baixa carga parasitária. A utilização desses métodos visa não somente à confirmação dos achados clínicos, mas pode fornecer importantes informações epidemiológicas, como a identificação da espécie de *Leishmania* spp. circulante na região (KUBISTA et al., 2006).

2.3.3 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é uma das técnicas moleculares utilizadas em diversas áreas da biologia, foi desenvolvida por Kary Mullis e baseia-se na amplificação em escala exponencial das sequências do fragmento de DNA alvo (KUBISTA, 2006). Atua na clonagem genética, sequenciamento, medição da expressão gênica e uma infinidade de outros usos. Na medicina, pode fazer a identificação precisa de microrganismos sejam patógenos individuais ou uma população de diversos organismos (KAUNITZ, 2015).

É uma metodologia altamente sensível e robusta baseada na DNA polimerase, uma enzima usada para amplificar uma porção de DNA *in vitro*. Esta capacidade essencial de produzir cópias perfeitas de material biológico atribui ao método um diferencial imensurável (POORNIMA, 2016).

No campo das doenças parasitárias, as leishmanioses em particular, a PCR destaca-se na identificação de espécies, alta sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez quando comparada aos testes tradicionais de pesquisa direta e cultura (RODRIGUES et al., 2000). Para os subgêneros *Viannia* e *Leishmania* revelaram sensibilidade variando de 95,5% e 88,2%, respectivamente e 100% de especificidade para amostras de indivíduos saudáveis, revelando-se mais eficientes que os exames convencionais (pesquisa direta e cultura) (BRITO et al., 2012).

Estudo realizado por Rodrigues et al, (2000) demonstram que a PCR amplifica o cinetoplasto, uma organela exclusiva dos cinetoplastídeos que contém aproximadamente 10.000 pequenos DNAs circulantes conhecidos como minicírculos de DNA (kDNA). Os

minicírculos possuem um tamanho entre 600 e 800 pb em membros do gênero *Leishmania* spp. (Figura 05).

2.3.4 PCR em tempo real (qPCR)

A PCR em tempo real surgiu em 1992 por Higuchi et al, (1993) para suprir necessidades da PCR convencional devido a limitações da técnica nos quesitos de amplificação de DNA e análise do produto (KUBISTA, 2006). O mecanismo da qPCR é semelhante ao da técnica da PCR convencional diferindo essencialmente numa característica inovadora: a possibilidade de quantificar o DNA em tempo real, podendo ser observada a cada ciclo. As fases de amplificação, detecção e quantificação são totalmente automatizadas (OLIVEIRA et al., 2010).

Outra vantagem do sistema de qPCR é que não é necessária uma segunda etapa para visualização dos fragmentos de DNA amplificados, como acontece na PCR convencional. Essa etapa de visualização pode ser principalmente por eletroforese em gel de agarose ou por placas de microtitulação de ELISA (KUBISTA et al., 2006).

O sistema da qPCR é baseado no uso de corantes e sondas fluorescentes que fazem o acompanhamento durante a amplificação. O SYBR Green I e TaqMan são os sistemas mais empregados para gerar fluorescência, sendo o SYBR um corante que se liga as fitas duplas de DNA durante a amplificação e a TaqMan uma sonda direcionada para a região específica interna que necessita ser amplificada, ao qual ocorre emissão de luz quando há sua degradação na reação (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2010).

A análise é feita através de gráficos que são gerados a partir da emissão de luz, estas são reconhecidas por um detector de sinal luminoso. A absorção da luz após cada ciclo da PCR gera um sinal que reflete a quantidade de produto formado (KUBISTA, 2006).

Durante os ciclos é formado o limiar threshold (Ct), sinalizando o ponto de corte que define positivo e negativo. Nos gráficos, quatro parâmetros são analisados: curva de amplificação, curva de dissociação, espectro e componente. Controles positivos e negativos devem ser incluídos em todas as reações (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2010).

No sistema *Sybr green*, um artifício que garante a especificidade de detecção é a obtenção da curva de dissociação dos oligonucleotídeos, também denominada como curva de *melting*. Através desta pode-se determinar o ponto correspondente à dissociação de 50% das cadeias de DNA. O pico na curva de *melting* é essencial para verificar se houve formação de um único produto, se foram formados produtos inespecíficos ou eventuais dímeros de oligonucleotídeos (NASCIMENTO et al., 2010).

As aplicações da PCR em tempo real são inúmeras como: perfilamento genético ou “*microarray*” que permite a análise de vários genes ao mesmo tempo, identificação de polimorfismos de nucleotídeos, genotipagem e discriminação alélica, detecção de translocações cromossômicas e na farmacogenética (NASCIMENTO et al., 2010).

Representando um avanço para o diagnóstico da LT, PAIVA-CAVALCANTI et al., (2013). desenvolveu dois ensaios de qPCR para a detecção de *L. (V.) braziliensis* em amostras de sangue de animais e humanos, obtendo-se positividade de 43,9% e 46,2 % respectivamente. Ambos com potencial de aplicação em áreas endêmicas, fornecendo uma ferramenta rápida e precisa para epidemiologia da doença.

2.3.5 Limitações testes moleculares

Os métodos de amplificação da molécula de DNA apresentam limitações, decorrentes de contaminação com DNA levando a resultados falso-negativos podendo ser devido à presença de inibidores da PCR (YANG; ROTHMAN, 2004). A fonte de contaminação de grande parte dos ensaios com patógenos, inclusive do gênero *Leishmania*, derivada de produtos amplificados em reações anteriores que podem ser transportados por meio dos reagentes, tubos, pipetas e bancadas.

Já os resultados falso-positivos podem ocorrer por diversos fatores como uma baixa quantidade de amostra de DNA, processamento das amostras e inibidores da enzima polimerase que podem estar presentes nas amostras.

A PCR e suas variações são amplamente utilizadas para diversos fins, entretanto uma das limitações principalmente relacionado a PCR convencional se deve a necessidade de se realizar a eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, o brometo

de etídio (que pode afetar a saúde durante uso prolongado) riscos de contaminação e a ausência da capacidade quantitativa

Figura 05. Longos maxicírculos indicados por seta conectando duas redes formadas por minicírculos (Borst & Hoeijmakers, 1979).



Fonte: Borst & Hoeijmakers, 1979

3 JUSTIFICATIVA

A LT incide em todas as regiões de Pernambuco, inclusive na região metropolitana do Recife, onde até recentemente não se verificava casos autóctones (BRITO et al., 2012). O município Moreno, registrou 100 casos suspeitos da LT no ano de 2015, de acordo com o dado do Núcleo de Vigilância em Saúde e Meio Ambiente do município, considerando ainda a subnotificação dos casos.

Nesse contexto, o projeto propõe preencher uma lacuna importante, que é o estudo da prevalência da infecção em animais domésticos assintomáticos na localidade de Engenho Jardim, município de Moreno, que podem estar realizando papel importante no ciclo de transmissão doméstico e peridoméstico. Esse estudo contribuirá para melhor compreensão desta endemia, possibilitando um planejamento eficaz no controle da doença na região.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Quais animais domésticos (canídeos, felídeos, equídeos e caprinos) assintomáticos podem estar envolvidos no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar em Engo. Jardim no município de Moreno, Região Metropolitana do Recife, realizando-se testes laboratoriais (imunológico e molecular) de diagnóstico?

5 HIPÓTESE

Os testes de diagnóstico laboratoriais podem revelar se os animais domésticos canídeos, felídeos, equídeos e caprinos assintomáticos estão envolvidos no ciclo de transmissão da Leishmaniose Tegumentar em Engo. Jardim no município de Moreno, Região Metropolitana do Recife.

6 OBJETIVOS

6.1 GERAL

Avaliar a prevalência da infecção em animais domésticos assintomáticos (canídeos, felídeos, equídeos e caprinos) por *Leishmania* spp. causadoras da leishmaniose tegumentar no município de Moreno, Região Metropolitana do Recife.

6.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência da infecção por *Leishmania* spp. em cães assintomáticos através de método imunológico (ELISA);
- Comparar entre leucócito e secreção conjuntival a amostra de melhor desempenho para confirmação da infecção por *Leishmania* spp. utilizando métodos moleculares;
- Avaliar a infecção nos animais a partir da carga parasitária;
- Verificar a concordância dos testes moleculares utilizados (i.e., PCR e PCR em tempo real).

7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

7.1 Área de estudo

O estudo foi desenvolvido em Engenho Jardim no município de Moreno (Figura 06), localizado na Região Metropolitana do Recife, estado de Pernambuco, Brasil. Distância 55.7 km da capital, compreende uma área de 195.603 km² e uma densidade populacional de 311.94 hab./km². Atividade econômica predominante nessa região é o cultivo da cana-de-açúcar. As casas são construídas em Mata Atlântica remanescentes com a presença do homem e de animais domésticos (e.g., cão, cavalo, gato, cabras e ovelhas). O principal vetor da região é o *Lutzomyia whitmani*, responsável pela transmissão da *L. (V.) braziliensis*.

Figura 06. Mapa do município de Moreno localizado na região metropolitana do recife



Fonte: O autor

7.2 Identificação dos animais

Foi realizada aplicação de questionário elaborado junto aos tutores dos animais da espécie canina para coleta de dados relacionados às principais variáveis epidemiológicas e caracterização da doença na população de estudo (Apêndice 1).

7.3 Aspectos éticos

Todos os proprietários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 2) e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do IAM/FIOCRUZ-PE, sob o número 115/2017 (Anexo 1).

7.4 Animais

Os animais domésticos foram avaliados pelo médico veterinário responsável pelo projeto obtendo-se um total de 272 animais. Foram incluídos de espécies e idades variadas, ambos os sexos, domiciliados no Engenho Jardim, município de Moreno – PE. O *n* amostral foi por conveniência.

Os animais foram submetidos à coleta de sangue por via endovenosa e coleta de secreção de conjuntiva utilizando *swab*. Foi realizado assepsia no local de coleta com algodão embebido em álcool etílico 70% e retirado entre 2-5 ml de cães (sangue periférico).

As amostras de equinos, caprinos e felinos foram cedidas pelo Serviço de Referência em Leishmanioses do IAM/FIOCRUZ- PE (Anexo 2). As amostras foram acondicionadas para posterior processamento no Laboratório de Imunoparasitologia-IAM/FIOCRUZ-PE.

7.5 Definição de assintomáticos, sintomáticos e oligosintomáticos

Os animais foram classificados como assintomáticos seguindo os critérios estabelecidos por MANCIANTI et al., 1988. Casos assintomáticos: ausência de sinais e sintomas característicos da infecção por *Leishmania* spp; Casos oligossintomáticos: adenopatia linfóide, ligeira diminuição de peso e/ou pelos opacos; Casos sintomáticos: todos ou alguns dos sinais graves da doença, ou seja, alterações cutâneas (depilação, eczema furfuráceo, úlceras), onicogribose, ceratoconjuntivite, rigidez dos membros posteriores, etc.

7.6 Critério de inclusão

Animais ausência de sinais e sintomas característicos da infecção por *Leishmania* spp. cujos tutores permitiram a coleta de amostras biológicas e estas foram suficientes para realização dos testes.

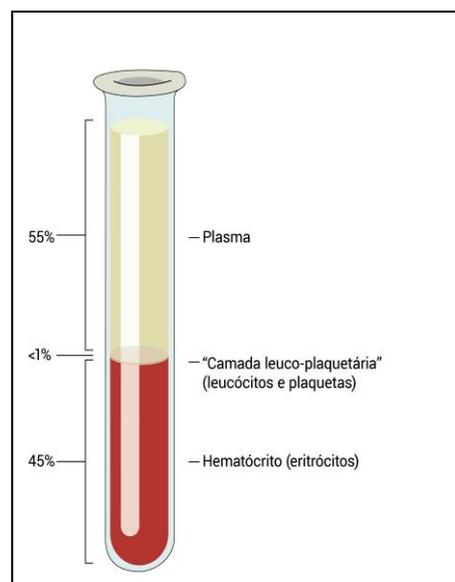
7.7 Critério de exclusão

Animais cujos tutores não permitiram a coleta de amostras biológicas; animais muito agressivos e que colocariam em risco a integridade física dos pesquisadores e de seus tutores ou animais cujas amostras biológicas foram insuficientes para os testes.

7.8 Obtenção do anel leucocitário e separação do plasma

O protocolo seguido para separação foi proposto por CASTRO (2011) onde sangue total obtido foi diluído em PBS pH 7,2 na proporção 2:1 e transferido para tubos cônicos contendo Ficoll-Hypaque (GE Healthcare), também na proporção 2:1. Após centrifugação, a 400 X g por 30 minutos a 20°C, a camada de PBMC obtida entre a mistura de Ficoll-Hypaque e o plasma foi removida, depositada em novos tubos cônicos e lavada com 20 ml de PBS. Depois de nova centrifugação a 300 X g por 15 minutos a 20°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 10 ml de PBS (pH 7,2) e novamente centrifugado a 300 X g, durante o mesmo tempo e mesma temperatura. Depois do descarte do sobrenadante, o sedimento composto de PBMC foi ressuspensionado em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB: Cultilab) e armazenado para posterior extração do DNA

Figura 07. Imagem ilustrativa da separação leucócitos e plasma sanguíneo



Fonte: <http://medicinanet.com>

7.9 Abordagem molecular

7.9.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído seguindo o protocolo de adsorção à sílica em suspensão proposto por DA SILVA (2017). Em cada 30 μL da amostra contendo até 5 μg de DNA foram acrescidos 75 μL de NaI 6 M. Adicionou-se à 5 μL da solução de suspensão em sílica e o tubo foi agitado em vortex durante um minuto e deixado em repouso no gelo por 4 minutos. Posteriormente, centrifugou-se a 15.800 x g por 30 segundos e na sequência o foi removido. Adicionou-se 700 μL da solução de lavagem gelada (etanol 50%, NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 1 mM pH 7,5), sendo repetida três vezes.

O sedimento foi ressuspendido em 10 μL de água tipo I autoclavada. A solução envolvendo o DNA foi incubada durante 5 minutos a 45 °C e após centrifugado a 15.800 x g por 30 segundos. Após esta etapa, o sobrenadante contendo DNA foi transferido para outro tubo e estocado a -20 °C. Um microlitro (1 μL) de cada amostra purificada foi utilizada para a quantificação do DNA genômico, utilizando o Nanodrop 2000 *Thermo Scientific*®, para avaliação do grau de pureza e concentração de DNA adequada à PCR convencional e qPCR.

7.9.2 PCR em tempo real (qPCR)

As amostras de DNA foram submetidas à PCR em tempo real (qPCR), conforme descrito por PAIVA-CAVALCANTI (2013) modificado. Este sistema utiliza o kDNA como alvo de detecção à região variável do minicírculo do cinetoplasto de *Leishmania (V.) braziliensis*, amplificando um fragmento de 138 pb. Utilizou-se 12,5 μL de Sybr Green, 9,5 μL H₂O milli-Q, e 0,5 μL de cada oligonucleotídeo iniciador para montagem do Master Mix. Em seguida foi incorporado 2,0 μL de DNA obtendo-se um volume final de 25 μL .

As amostras foram testadas em duplicata e à amplificação constituiu-se de 40 ciclos onde houve desnaturação a 95 °C por 15s e anelamento dos oligonucleotídeos a 60 °C por 1 min, seguindo as especificações *Applied Biosystems* (2005). O limite mínimo de detecção da técnica é de 1fg de DNA na amostra. Em seguidas os resultados foram analisados no software *QuantStudio™ Design and Analysis*.

7.9.3 Curva de Diluição

Foi avaliada a sensibilidade de detecção de DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis* utilizando cepa de referência (IOC-566-MHOM/BR/75/M2903). O DNA foi diluído em série nas concentrações de 10ng/L á 1fg/ μ L .

7.9.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR convencional)

O DNA das amostras de sangue e *swab* foram submetidos à amplificação em um termociclador, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos que permitem à amplificação do kDNA de *Leishmania* pertencente ao subgênero *Viannia* LEIB1 (5'-GGGTTGGTGTAATATAGTGG-3') e LEIB2 (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3') tendo como alvo de detecção o kDNA do parasito, equivalente a 750 pb, de acordo com as condições descritas por De BRUIJN E BARKER (1992).

O volume final da reação foi de de 25 μ L contendo Tris - HCl (10 mM), KCl (50 mM), MgCl₂ (1,5 mM), dNTP (0,2 mM), 25 μ moles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores e 2,5 μ da enzima Taq DNA Polimerase e por fim dois microlitros da amostra de DNA foi analisada (concentração). A amplificação constitui-se de 35 ciclos: 94°C (1 min), 65°C (1 min) e 72°C (1 min) (ERESH; McCALLUM; BARKER, 1994), precedidos de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C.

Um controle negativo (sem DNA) foi adicionado à reação, juntamente a dois controles positivos (10 μ g/ μ L e 1 μ g/ μ L) de DNA genômico de *L. (V.) braziliensis*, cepa de referência (IOC-L-566-MHOM/BR/75/M2903).

7.9.5 Análise dos produtos de PCR

Dez microlitros do produto da PCR foi analisado através de eletroforese em gel de agarose a 1,0 %, corados pelo brometo de etídeo a 0,05 μ g/mL (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e visualizados em um transluminador de luz ultravioleta e fotografadas com o sistema Kodak[®], modelo *Gel Logic 100 Imagem System*.

7.10 Abordagem Imunológica

7.10.1 Obtenção das formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

As alíquotas de culturas das formas promastigotas da *L. (V.) braziliensis*, foram obtidas a partir da cepa de referência (MHOM/BR/75/M2903). Estas foram mantidas *in*

vitro, expandidas em meio Schneider's e acompanhadas até que fosse atingido a fase exponencial de crescimento. Após esta etapas, os flagelados foram transferidos para tubos de polipropileno de 50 mL, e submetidos a uma centrifugação leve (100 X g) a 25°C por 10 minutos.

Em seguida os parasitos foram retirados do sobrenadante e houve lavagem em solução salina tamponada contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), por três vezes, a 4°C, 871 X g durante 10 minutos. O sedimento formado foi resuspenso em paraformaldeído a 1%, depois incubado por 24 horas a 4°C. Ao termino da incubação os parasitos foram novamente lavados entretanto em SFB 3% duas vezes. Por fim, uma alíquota foi retirada e contada em câmara de Neubauer.

7.10.2 Antígenos de *L. (V.) braziliensis* para teste de ELISA

As formas promastigotas mantidas *in vitro* como descrito no item 7.7.1 foram transferidos para tubos Falcon estéril e submetidos a centrifugação de 400 X g por 10 minutos, na etapa seguinte foram realizadas sucessivas lavagens (3x) com solução salina tamponada, 1x e pH 7.2 e o pellet formado foi ressuspenso com 750µL da solução tampão de lise branda e 250µL de inibidor de protease.

O conteúdo formado foi transferido para microtubos de 1,5mL e em segunda foram realizados sucessivos congelamentos e descongelamentos com o objetivo de lise celular em nitrogênio líquido e banho Maria 36°C, respectivamente. Após esta etapa 20µL foram analisados em lâmina microscópica para verificar a viabilidade celular e caso necessário realizar novas etapas de congelamento e descongelamento.

A solução foi centrifugada a 10.000 X g a 4°C por 15 min e os antígenos solúveis coletados no sobrenadante, quantificados com reagente de Bradford (10µL da suspensão antigênica, 200µL de Bradford e 790µL de água deionizada), alíquotados em microtubos de 1,5mL e congelados a -80 °C para posterior utilização.

7.10.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O ensaio de ELISA foi realizado *in house* seguindo o protocolo de SILVA et al. 2019 onde houveram adaptações. Inicialmente uma placa de fundo chato 96 poços foi sensibilizada com 200 µL do antígeno a 500ng/mL, previamente diluído em tampão

Carbonato/Bicarbonato 0.06 M pH 9.6. Foi realizada uma primeira incubação a 4°C por 18 horas em câmara úmida.

Após incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS 0.015 M pH 7.2 contendo 0.05% de tween 20. Os soros foram diluídos em 1:450 de PBS 0.015 M pH 7.2 contendo 0.05% de tween 20 e 10% de leite em pó desnatado. A cada placa foram adicionados controles positivos e negativos com as mesmas diluições das amostras. Foram adicionados 100 µL por poço das amostras de soro dos cães diluídos e a placa foi incubada por 1 h em câmara úmida a 37°C e posteriormente lavada, como descrito anteriormente.

Após essa etapa, foi realizada uma incubação de 1 hora com 100 µL de anti- IgG de cão cadeia gama específica conjugada à peroxidase, no título ideal para o teste (Calbioquem, título de 1/2500). A placa foi lavada mais 3 vezes com PBS 0.015 M pH 7.2 contendo 0.05% de tween 20, como já descrito, e 150 µL por poço do cromógeno (ácido 5-amino salicílico ou OPD) com o peróxido de hidrogênio foram adicionados. Após 30 minutos de incubação em câmara úmida à temperatura ambiente e na ausência de luz, a reação foi parada com 100µL por poço de ácido sulfúrico 1M.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm e a leitura da absorbância de cada amostra foram expressos em densidade óptica (DO). Para interpretação dos resultados, o limiar de reatividade foi calculado considerando a média aritmética das absorbâncias das diluições do controle negativo mais 2 vezes o desvio padrão. Assim, foram consideradas amostras positivas as que apresentarem títulos iguais ou maiores que o resultado da relação descrita acima.

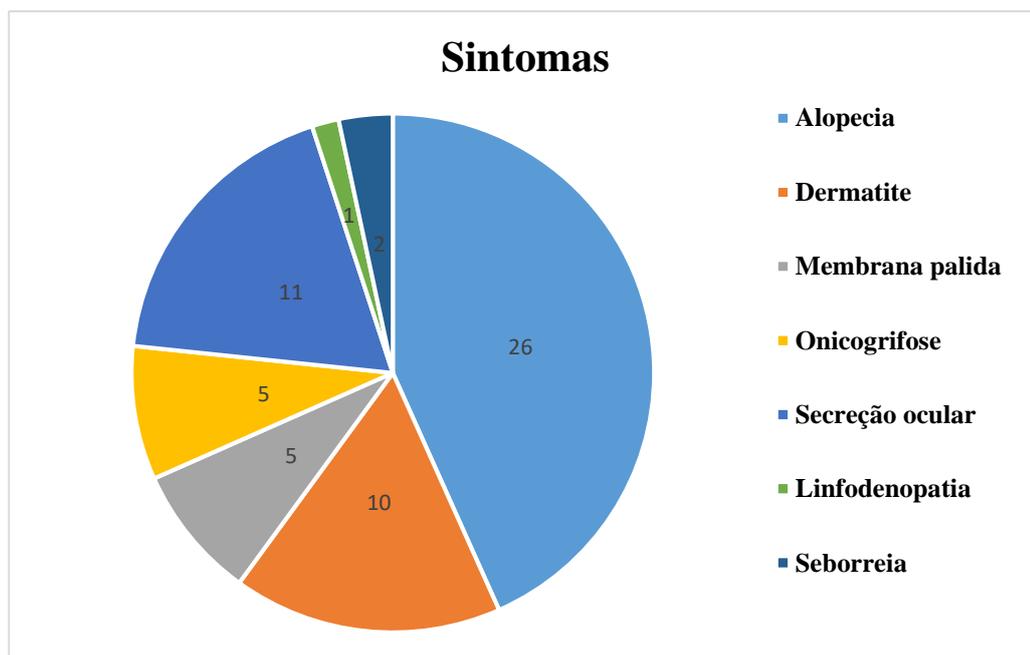
7.11 Análise estatística

O banco de dados para inserção dos resultados foi construído no programa estatístico IBM SPSS Statistics 20.0. Para análise de concordância entre os testes, foi utilizado método de Jacob Cohen (1960) (Kappa). Para ambos os testes foi tomado o nível de significância de 5%. Em relação prevalência da doença foi realizado o cálculo do *cut-off* na população de estudo e os gráficos gerados no programa GraphPad Prism a versão 7.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA).

8 RESULTADOS

Nesse estudo foram coletadas amostras de 272 animais domésticos separados em cinco espécies (*Canis familiaris*, *Felis catus*, *Equus caballus*, *Equus asinus*, *Capra hircus*). Após análise do questionário e do médico veterinário foram observados os seguintes sintomas descritos no gráfico 01 em animais da população de estudo:

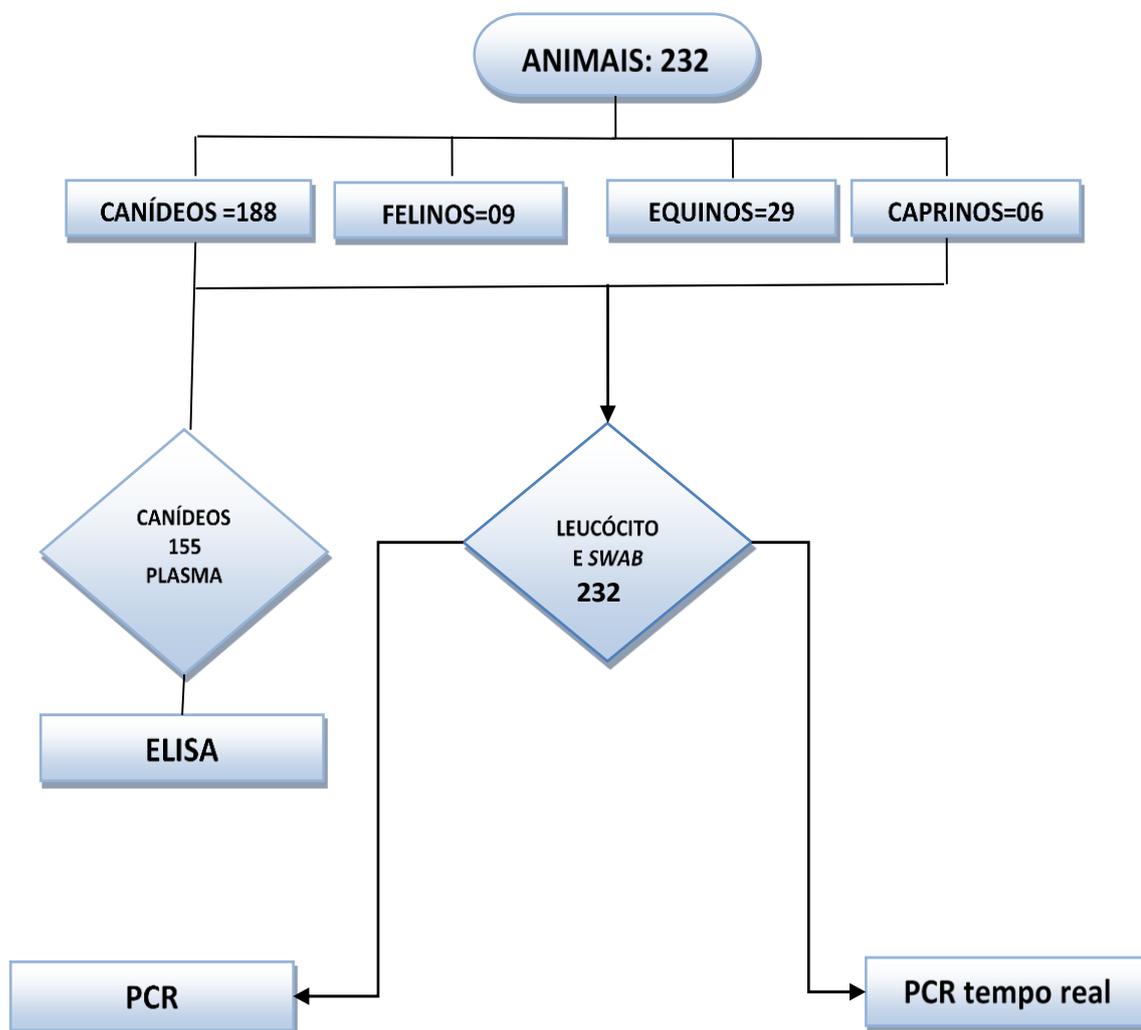
Gráfico 01. Sintomas sugestivos de leishmaniose tegumentar nos animais domésticos



Fonte: O autor

Desta forma foram incluídos no estudo 232 animais que não possuíam nenhum dos sintomas descritos acima, sendo: 188 cães, 21 cavalos, 09 gatos, 08 burros, 06 cabras. Devido ao critério de exclusão aplicado, a quantidade de amostras nos testes foi variada. Segue abaixo fluxograma aplicado no estudo (Figura 08).

Figura 08. Fluxo demonstrativo de obtenção dos animais até os testes realizados

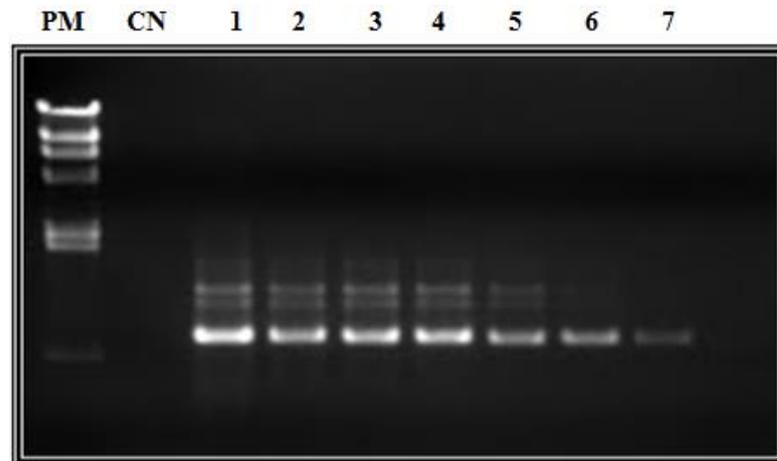


Fonte: O autor

8.1 Curva de diluição de DNA genômico de *L. (V.) braziliensis*

A curva de diluição de *L. (V.) braziliensis* foi realizada utilizando-se a cepa de referência (IOC-566-MHOM/BR/75/M2903) e obteve uma detecção máxima de 10 fg para PCR convencional (Figura 09).

Figura 09. Curva de diluição de *L. V. braziliensis* com detecção de 10 fg na PCR convencional

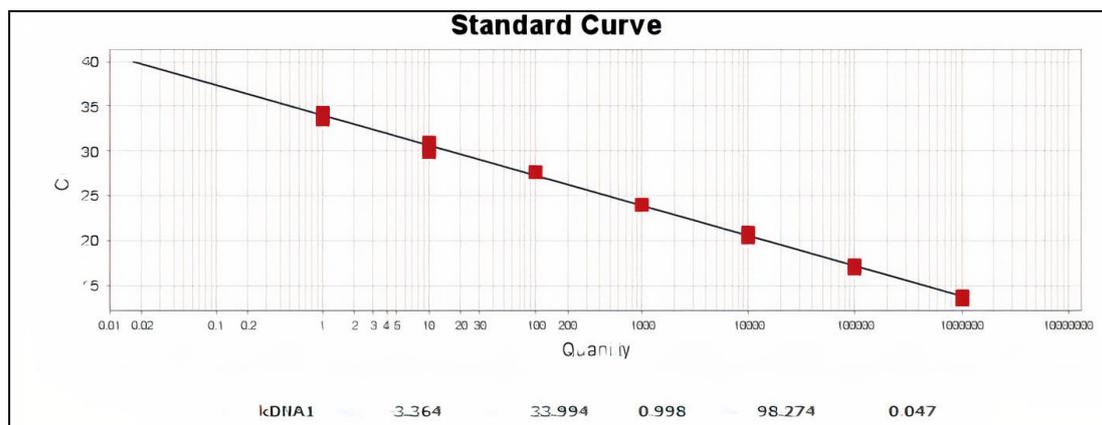


Legenda: PM: Peso Molecular, CN: Controle Negativo.

Fonte: Brito M.E.F

Na PCR em tempo real obteve-se uma eficiência de 98% com limite de detecção de 1fg de DNA de *L. (V.) braziliensis* (Figura 10).

Figura 10: Curva de diluição para *L. V. braziliensis* na qPCR com eficiência de 98%.



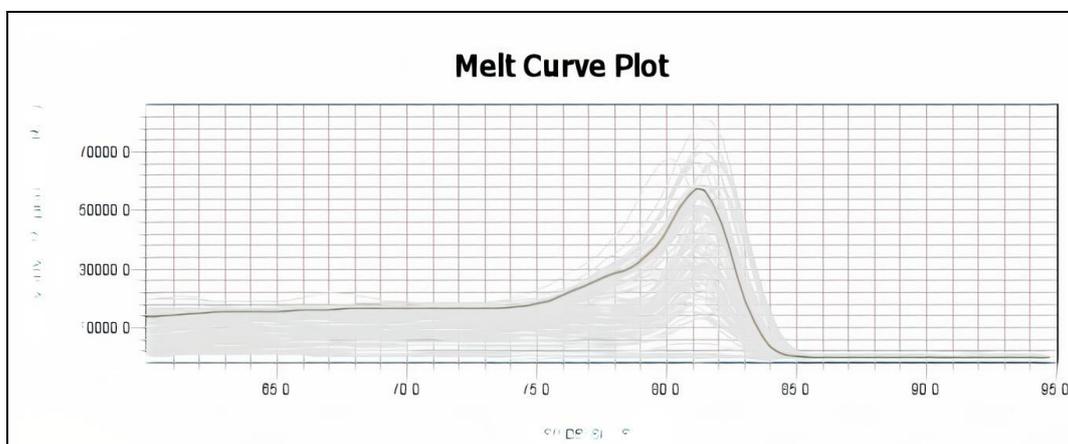
Fonte: O autor

8.2 PCR em Tempo Real

8.2.1 Leucócitos

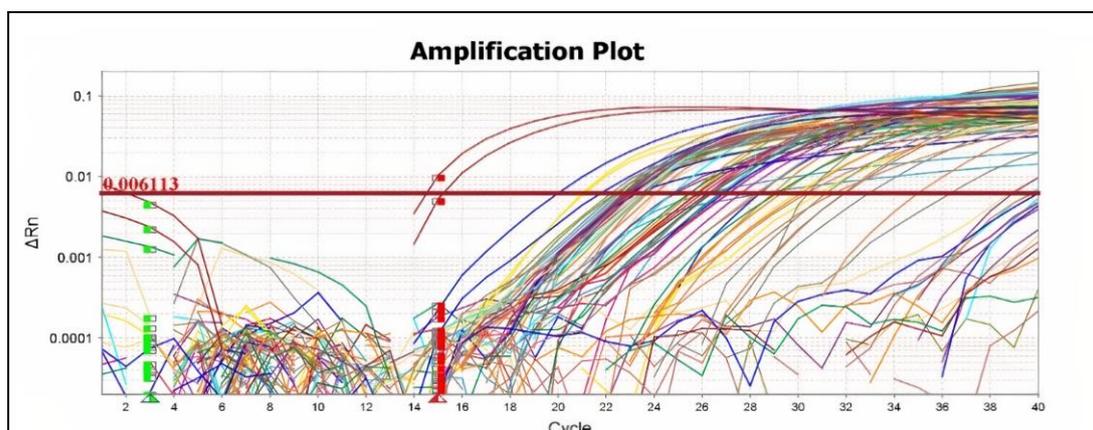
Para PCR em tempo real (qPCR) os resultados das amostras de leucócitos demonstraram pico específico para *L. (V.) braziliensis* de 81,03 °C, variando entre 79 °C e 82 °C para espécie (Figura 11). A amplificação das amostras de leucócito dos animais domésticos encontra-se descrito abaixo (Figura 12). Das cinco espécies analisadas foram positivos para técnica as seguintes porcentagens: *Canis familiaris* 68,2%, *Felis catus* 100%, *Equus caballus* e *Equus asinus* 77,3%, *Capra hircus* 50% (Tabela 01).

Figura 11. Curva de melting com uma amostra positiva para *L. V. braziliensis*



Fonte: O autor

Figura 12. Amplificação de DNA de *L. V. braziliensis* em leucócitos por qPCR.



Fonte: O autor

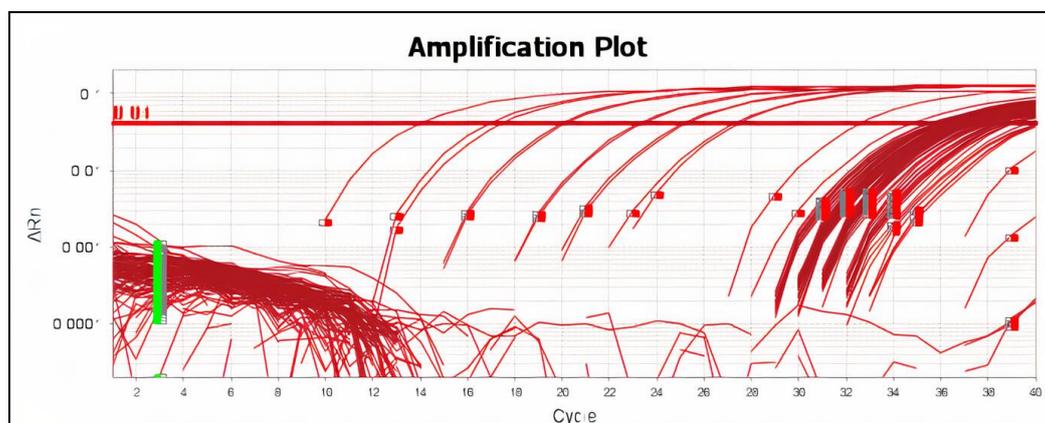
Tabela 01. Resultados da qPCR em amostras de leucócitos de animais domésticos por espécie.

| Espécies | qPCR | | Total (%) |
|-------------------------------------|--------------|--------------|------------|
| | Positivo (%) | Negativo (%) | |
| <i>Canis familiaris</i> | 120 (68,2%) | 56 (31,8%) | 176 (100%) |
| <i>Felis catus</i> | 09 (100 %) | 00 | 09 (100 %) |
| <i>Equus caballus /Equus asinus</i> | 17 (77,3%) | 05 (22,7%) | 22 (100%) |
| <i>Capra hircus</i> | 03(50,0%) | 03 (50,0%) | 06 (100%) |
| Total | 149 | 64 | 213 |

Fonte: O autor

8.2.2 Swab conjuntival

Em relação às amostras de *swab* conjuntival, o gráfico de amplificação encontram-se abaixo (Figura 13). Os resultados dos animais positivos em relação às espécies seguem: *Canis familiaris* 68,2%, *Felis catus* 100%, *Equus caballus* e *Equus asinus* 77,3%, *Capra hircus* 50% (Tabela 02).

Figura 13. Amplificação de DNA de *L. V. braziliensis* em *swab* conjuntival por qPCR

Fonte: O autor

Tabela 02. Resultados da qPCR em amostras de *swab* conjuntival de animais domésticos por espécie

| Espécies | qPCR | | Total (%) |
|-------------------------------------|--------------|--------------|------------|
| | Positivo (%) | Negativo (%) | |
| <i>Canis familiaris</i> | 35 (26,9%) | 95 (73,1%) | 130 (100%) |
| <i>Felis catus</i> | 05 (41,7%) | 07 (58,3%) | 12 (100%) |
| <i>Equus caballus /Equus asinus</i> | 04 (30,8%) | 09 (69,2%) | 13 (100%) |
| <i>Capra hircus</i> | 01 (33,3%) | 02 (66,7%) | 03 (100%) |
| Total | 45 | 113 | 158 |

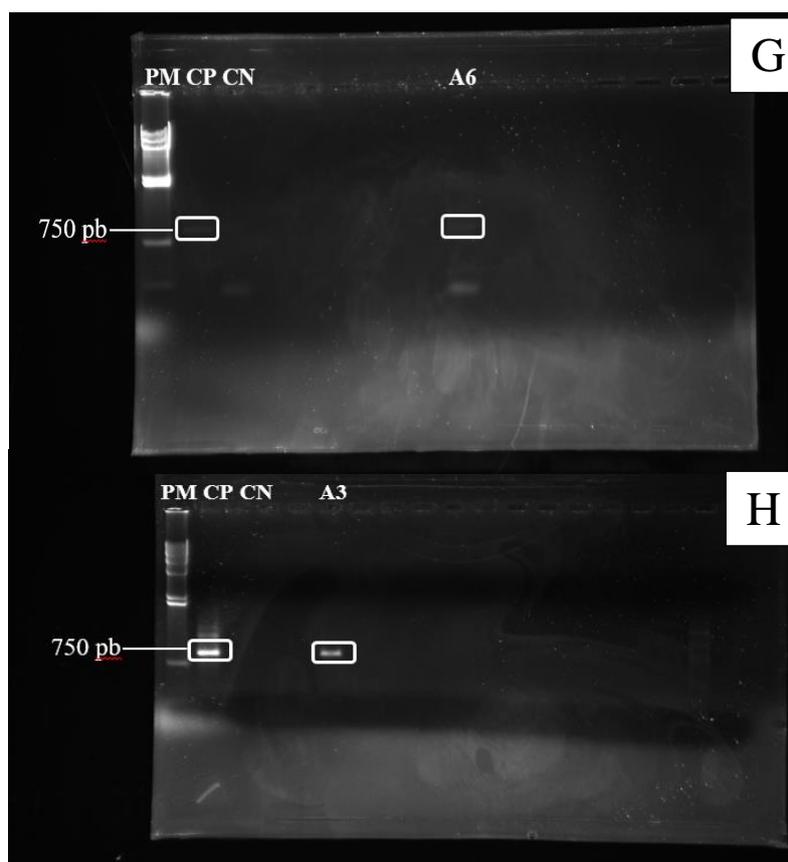
Fonte: O autor

8.3 PCR Convencional

8.3.1 Leucócitos

Na PCR convencional duas amostras obtiveram amplificação em 750 pb para técnica (Figura 14 - G e H), e pertenciam a espécie *Canis familiaris*, com frequência porcentual de 2,05%. As demais espécies não foram detectáveis (Tabela 03).

Figura 14. Amplificação de DNA de *L. V. braziliensis* em leucócito por gel de agarose



Legenda: PM – peso molecular ; CP- controle positivo; CN – controle negativo; A6- amostra 6; A3- amostra 3; PB- pares de base.

Fonte: O autor

Tabela 03. Tabela dos animais por espécie (%) em leucócitos na PCR convencional

| Espécies | PCR | | Total (%) |
|-----------------------------------|--------------|--------------|-----------|
| | Positivo (%) | Negativo (%) | |
| <i>Canis familiaris</i> | 02 (2,05) | 77 (97,5) | 79 (100) |
| <i>Felis catus</i> | 00 | 09 (100) | 09 (100) |
| <i>Equus ballus /Equus asinus</i> | 00 | 22 (100) | 22 (100) |
| <i>Capra aegagrus hircus</i> | 00 | 03 (100) | 03 (100) |
| Total | 02 | 111 | 113 |

Fonte: O autor

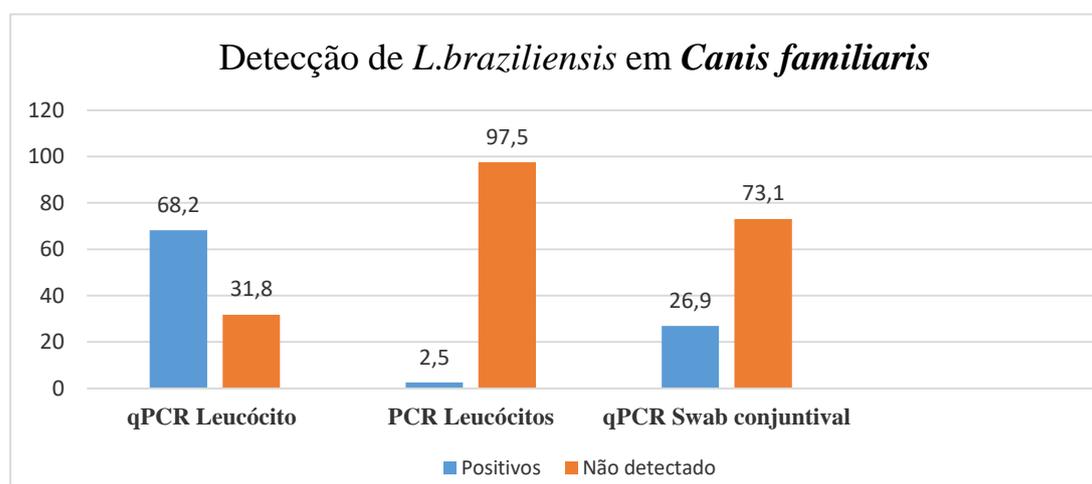
8.3.2 Swab conjuntival

Para amostras de *swab* conjuntival não houve amplificação para técnica de PCR convencional em nenhuma delas.

8.4 Identificação de *L. (V.) braziliensis* nos testes moleculares por espécie

8.4.1 *Canis familiaris*

A detecção de *L. (V.) braziliensis* em amostras cães demonstram uma maior positividade quando aplicada a técnica de qPCR em combinação com amostras de leucócitos 68,2% (Gráfico 02).

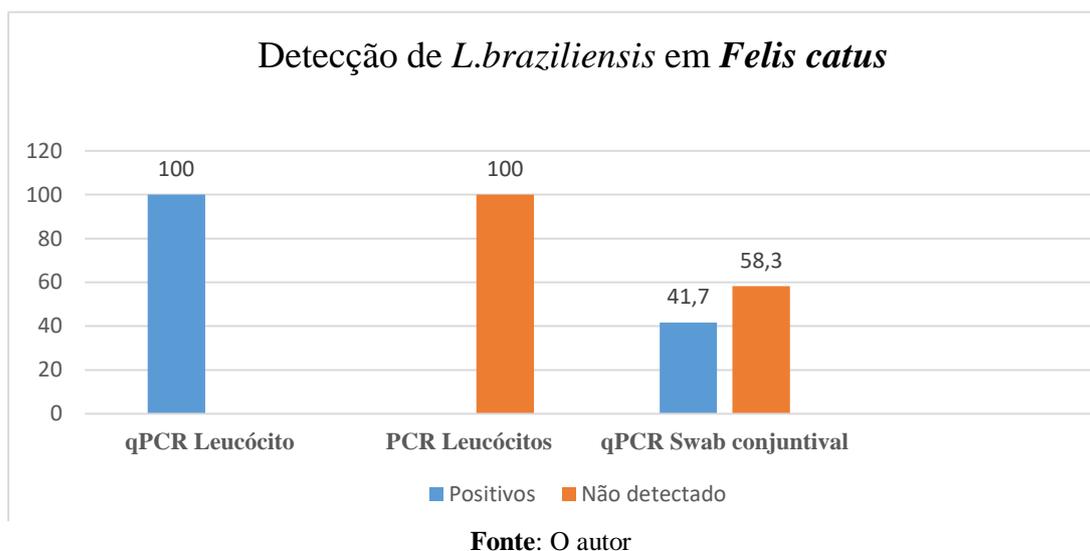
Gráfico 02. Detecção de *L. braziliensis* em *Canis familiaris* por testes moleculares

Fonte: O autor

8.4.2 *Felis catus*

Nos felinos a detecção da *L. (V.) braziliensis* utilizando a técnica de qPCR em junção com amostras de leucócitos se mostrou 100% positiva, enquanto a PCR convencional não houve detecção do parasito. Para *swab* conjuntival os resultados positivos e não detectados foram respectivamente 41,7 % e 58,3 % (Gráfico 03).

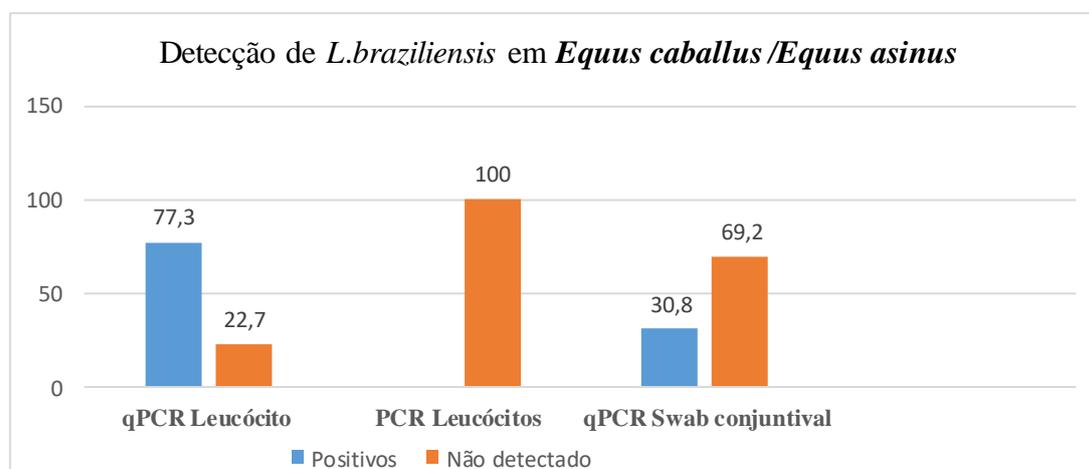
Gráfico 03. Detecção de *L. braziliensis* em *Felis catus* por testes moleculares



8.4.3 *Equus caballus /Equus asinus*

As amostras de leucócitos em relação a qPCR em equinos obteve-se uma positividade de 77,3% enquanto para PCR convencional não foram identificados DNA de *L. (V.) braziliensis*. Para *swab* conjuntival a qPCR obteve positividade de 30,8% e não foi identificado em 69,2% (Gráfico 04).

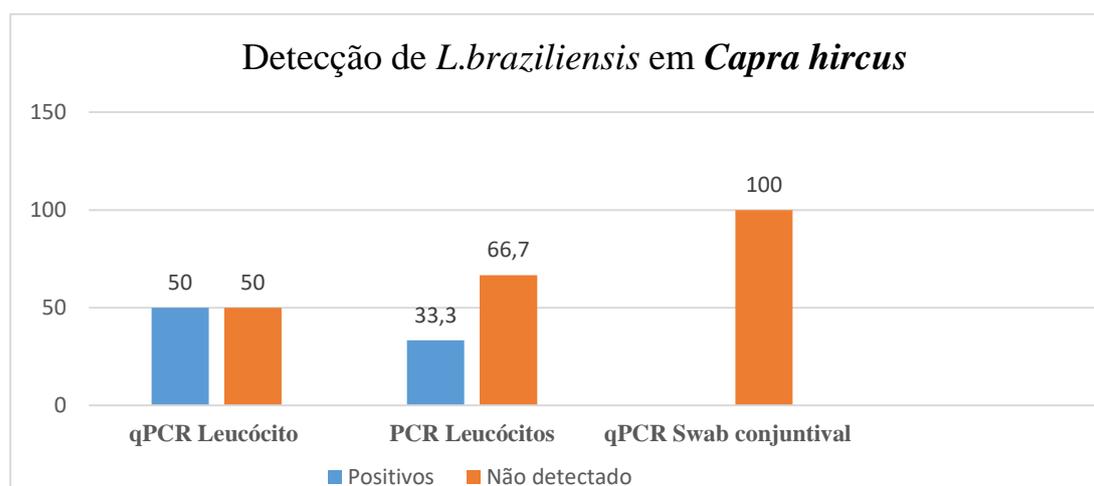
Gráfico 04. Detecção de *L. braziliensis* em *Equus caballus/Equus asinus* por testes moleculares



8.4.4 *Capra hircus*

Para os caprinos as percentagens de positivos e não identificados foram igualmente de 50%. Para PCR convencional os leucócitos obtiveram 33,3 % de positividade e 66,7% das amostras não houve identificação do parasito. Em 100% das amostras de *swab* conjuntival também não houve identificação (Gráfico 05).

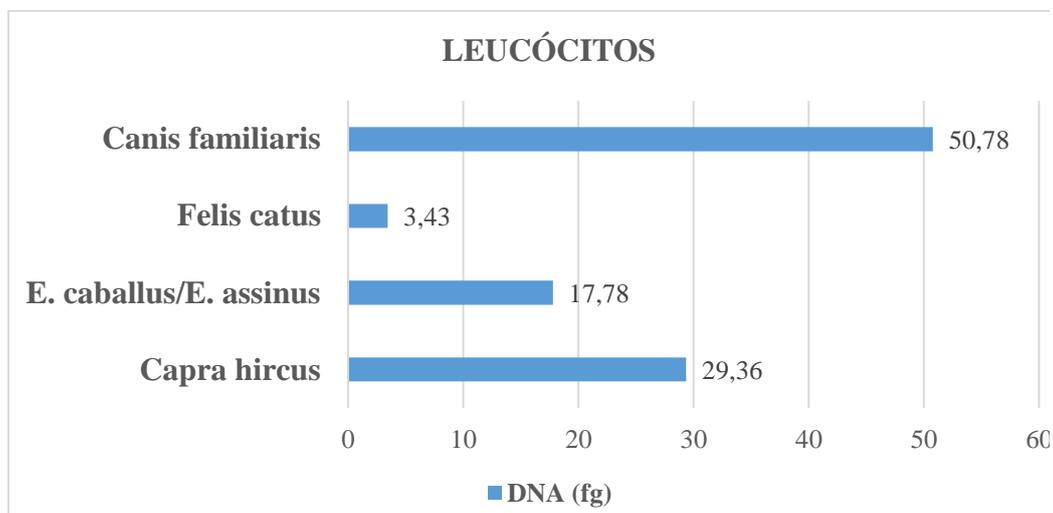
Gráfico 05. Detecção de *L. braziliensis* em *Capra hircus* por testes moleculares



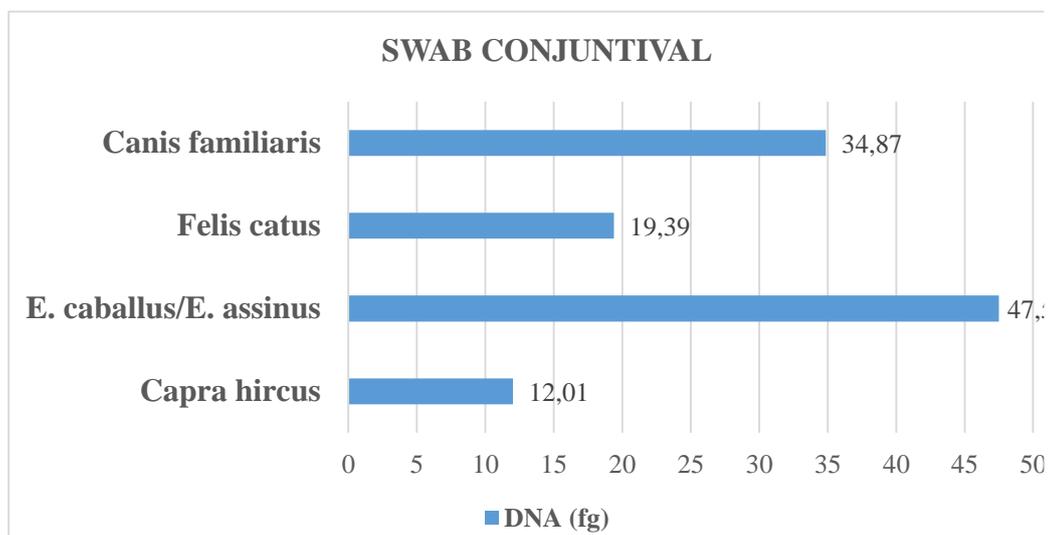
Fonte: O autor

8.5 Quantidade de média de DNA de *L. (V.) braziliensis* nos animais

Foi observada a concentração média DNA nos animais de estudo. Obteve-se uma média para leucócitos de 40,12 fg e para *swab* conjuntival 35,06. Para quantificação média por espécie obteve-se os seguintes dados para leucócitos: *Canis familiaris*: 50,78 fg, *Felis catus*: 3,43 fg, *E. caballus/E. assinus*: 17,78 fg, *Capra hircus*: 29,36 fg e para *swab* conjuntival: *Canis familiaris*: 34,87 fg, *Felis catus*: 19,39 fg *E. caballus/E. assinus*: 47,51 fg *Capra hircus*: 12,01 fg (Gráfico 06 e 07).

Gráfico 06. Concentração média de DNA por espécie em leucócitos

Fonte: O autor

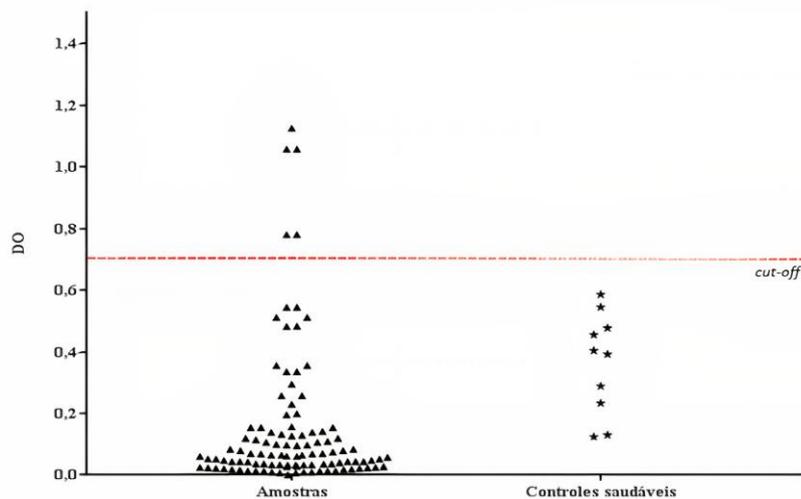
Gráfico 07. Concentração média de DNA por espécie em swab conjuntival

Fonte: O autor

8.6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Os testes de ELISA foram realizados com o objetivo de verificar a prevalência na população de estudo e estão descritos no gráfico 1. Foram realizados com 115 cães obtendo-se um limiar de 0,689 de soroprevalência para *L. braziliensis*, 10 animais saudáveis foram utilizados como controles negativos. Dos 115 plasmas de cães incorporados ao teste, 5 foram positivos, ultrapassaram o limiar de 0,689 (Gráfico 08).

Gráfico 08. Prevalência para infecção por *L. braziliensis* em *Canis familiaris*



Fonte: O autor

8.7 Teste de concordância KAPPA

O teste de concordância de Kappa entre PCR convencional e qPCR para leucócitos obteve um índice de 1%, $p=0,001$ (significante). O cruzamento das amostras foi concordante em 02 animais da espécie *Canis familiaris*, obteve-se uma baixa concordância entre os testes. Para *swab* conjuntival não foi possível realizar a concordância entre as técnicas pois não foi obtido nenhum resultado positivo para *Leishmania* spp na PCR convencional.

9 DISCUSSÃO

A leishmaniose tegumentar é uma doença infecto-parasitária que possui uma ecoepidemiologia capaz de estabelecer diversos ciclos de transmissão que envolve uma variedade de reservatórios e vetores, a depender de cada região. A participação dos animais domésticos no ciclo epidemiológico da LT nas Américas é descrita na literatura desde o início do século (WEIGLE; SARAIVA, 1996; BRANDÃO-FILHO et al., 1999; BEVENGA, 2013).

A infecção por *Leishmania* spp. nos animais pode cursar de forma assintomática, oligossintomática ou sintomática. Nos cães, que são os animais mais relatados na literatura, é observado cerca de 60% de assintomáticos e os sinais clínicos podem demorar de meses a anos para se manifestar após a infecção. Quando esses sintomas se desenvolvem, eles ocorrem primariamente como lesão cutânea evoluindo para sistêmica (FALQUETO et al., 1986; BRILHANTE et al., 2017).

No estudo, as manifestações clínicas mais frequentes foram alopecia, secreção ocular e dermatite, que são sinais inespecíficos para diversas infecções (PISANI et al., 2017; ARMANDO., 2017; DA ROCHA BRAGA et al., 2018). A lesão compatível com LT é o marcador de animal sintomático. No entanto, a associação de alguns sintomas clínicos também pode estar diretamente relacionada à infecção por LT, mesmo que o animal não tenha desenvolvido (ainda) lesão.

Estudos com animais assintomáticos demonstram que cerca de 21,3% possuem a capacidade de infectar flebotomíneos com *Leishmania* spp (DA COSTA-VAL et al. 2007). O diagnóstico da LT, principalmente em casos de animais assintomáticos, é crucial para contenção de um possível surto, uma vez que animais domésticos e peridomésticos podem estar envolvidos no ciclo de transmissão (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2010; PORTELA.,2018). Para confirmação da infecção por LT, diversos tipos de testes laboratoriais podem ser utilizados como os parasitológicos, imunológicos e moleculares (ANDRADE et al., 2008).

Nos testes moleculares utilizados, o sistema de PCR convencional e a qPCR, o alvo utilizado foi o kDNA, por ter alta sensibilidade de detecção (DISCH et al., 2005).A PCR convencional apresentou positividade menor do que na qPCR nas amostras biológicas de sangue e *swab* conjuntival utilizadas. Isso pode ser explicado devido a

variação do protocolo utilizado nos dois sistemas. Diversos fatores influenciam na melhor capacidade de detecção de DNA em um sistema molecular, tais como: a escolha da técnica (que pode ser mais sensível que outra), o método de extração, a escolha dos *primers* iniciadores, o tipo de amostra clínica utilizada e o tempo de infecção em cada animal, que interfere na carga parasitária. O tipo de coleta das amostras biológicas é um dos fatores importantes para induzir resultados melhores ou não (PORTELA., 2018).

A qPCR mostra-se, em diversos estudos, uma técnica de detecção sensível, específica, rápida na detecção de parasitas (FERNANDES et al.,2019; DA SILVA SALES et al., 2020; THOMAZ et al., 2021). Sendo amplamente utilizada em diversas amostras biológicas para identificação de DNA parasitário, como a exemplo do sangue (GOMES., 2015).

Sabe-se que os amastigotas da *Leishmania* spp. são preferencialmente encontrados no interior das células polimorfonucleadas. Portanto os nossos resultados demonstraram maior positividade para LT em amostras de leucócitos utilizando a qPCR, sendo coerente com esse comportamento dos amastigotas (CONTER., 2013).

Para a amostra de *swab* conjuntival, os resultados condizem com os achados de ADAMS et al.(2014) onde a amostra obteve positividade, mesmo com baixa parasitemia, demonstrando viabilidade neste tipo de coleta associado à qPCR (BENASSI et al., 2017), tanto em animais sintomáticos quanto assintomáticos (FERREIRA et al., 2008 ; PILATTI et al., 2009; LEITE et al., 2010).

Apesar de amostras de *swab* da conjuntiva possuírem baixa positividade em relação aos leucócitos, pode indicar que esse não é um local de migração costumeira do parasita. Contudo, o *swab* conjuntival é uma amostra de coleta ambulatorial, pouco invasiva e com certo grau de positividade podendo ser utilizada facilmente em animais, sobretudo no campo (OLIVEIRA et al., 2015).

Apesar da baixa positividade, o *swab* conjuntival associado à coleta de leucócitos acrescentou 1,75% de positividade à detecção de infecção por LT na população estudada. Isso significa que, se somente os leucócitos fossem processados pela qPCR, quatro animais seriam considerados sem infecção. Todos eles são cães com quantidades de DNA de *L. (V.) braziliensis* variando de 1.27fg a 2.62fg. Portanto,

mesmo que o acréscimo tenha sido baixo (menos de 2%), o *swab* de conjuntiva ocular associado a outras amostras pode aumentar a capacidade geral do teste diagnóstico em identificar a infecção.

O método de coleta por *swab* revela-se um aliado no diagnóstico da *Leishmania* spp. O potencial da coleta não invasiva de diversas amostras clínicas como o *swab* conjuntival, nasal, oral, e pele de orelha para o diagnóstico molecular utilizando a PCR convencional e qPCR (DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2008; 2012) revela um bom desempenho para ambas as técnicas a partir de animais assintomáticos. Constatou-se que este procedimento pode ser utilizado para diagnóstico em casos sem sintomatologia da doença (LEITE et al., 2010).

Foi observado que a quantidade média, em fg, de DNA nos leucócitos dos cães foi a maior entre os animais. Já os gatos possuíram a menor quantidade média de DNA em leucócitos dentre as espécies em nosso estudo (menos de 5fg). A leishmaniose em felinos tem sido descrita ao redor do mundo, mas seu papel como reservatório ainda não está bem elucidado. No Brasil, eles foram relacionados como possível reservatório ao agente etiológico *Leishmania (V.) braziliensis* (SCHUBACH et al., 2004; DE SOUZA et al., 2005).

Para avaliar a existência de um ciclo de transmissão envolvendo os gatos é necessário estudos que comprovem a transmissão do parasito para os vetores na natureza além de estudo baseados no xenodiagnóstico (MANCIANTI, 2004; MAIA et al., 2010). Estudo como o de SIMÕES- MATOS et al. (2005) sugerem que os felinos apresentem resistência natural ao parasito, entretanto essa resistência pode depender de fatores genéticos e não apenas celular (MANCIANTI, 2004).

Quando a amostra biológica foi o *swab* conjuntival os equinos obtiveram a maior quantidade de DNA (47,51). O primeiro relato nos equinos foi descrito em cavalos na Argentina por MAZZA (1926) e em Jumentos no Brasil no Estado do Ceará por ALENCAR (1959). Em seguida, houve vários relatos como de AGUILAR et al. (1986) no Rio de Janeiro, e em Pernambuco com BRANDÃO-FILHO et al., (2003), todos sendo o agente etiológico a *Leishmania (V.) braziliensis* (LIMA et al., 2020).

As lesões em equinos são frequentemente autolimitadas e normalmente possuem baixa parasitemia por não serem muito receptivos infecção por *Leishmania* spp. e pela resposta imune eficaz na eliminação do parasita (DHAOUADI et al., 2018). Em nosso estudo apesar dos equinos apresentarem média parasitaria acima dos outros animais analisados a positividade das amostras foi menor em relação aos não detectados.

Para os caprinos houve a menor quantificação em *swab* conjuntival, estudos são escassos na descrição da espécie *Capra hircus*, principalmente referente a LT. Entretanto, foi observado positividade em caprinos como estudo de AL-ZAHRANI et al. (1989) investigando o peridomicílio de 50 pacientes com LV na Arábia Saudita, eles constataram a frequente presença de ovinos, caprinos, gatos e cães em áreas próximas às casas destes pacientes.

Quanto ao ELISA, a infecção por *L. (V.) braziliensis* na sorologia foi observada em 5 cães, 4.34% (5/115). A técnica avaliou a infecção pelo patógeno a partir do plasma sanguíneo. Atualmente, segundo a nota técnica conjunta No 01/2011 – CGDT – CGLAB/DEVIT/SVS/MS, o diagnóstico sorológico para cães preconizado pelo Ministério da Saúde é o teste imunocromatográfico denominado “TR DPP® Bio-Manguinhos”, que é usado como exame de triagem, e o teste ELISA indireto como exame confirmatório (JUNIOR et al., 2015).

Apesar do ELISA ser referência para os cães, uma limitação da técnica deve-se à difícil distinção entre infecção recente ou antiga pela titulação dos anticorpos, além de reações cruzadas. Antígenos de superfície e antígenos dos microtúbulos do citoesqueleto do protozoário são comuns a todos os tripanosomatídeos o que justifica a ocorrência de reação cruzada entre eles (BADARÓ et al., 1986; LUCIANO, 2009).

Quando aplicado em estudos epidemiológicos na LT, a especificidade do ELISA pode tornar-se baixa, devido a ocorrência a de reações inespecíficas (MADEIRA et al., 2003). No estudo GONTIJO (2007) observou um grande número de animais assintomáticos e positivos na PCR (69/73), muitos eram negativos nos exames sorológicos (93%). É afirmado ainda por GONTIJO (2007) ser possível que alguns dos cães com sorologia negativa entraram em contato com o parasito, se infectaram, mas não tinham produzido ainda títulos detectáveis de anticorpos, o que pode ter ocorrido em nosso trabalho.

O estudo ainda afirma que “Os métodos sorológicos falham em detectar cães infectados no período pré-patente da infecção e antes da soroconversão, aqueles que nunca vão soroconverter e os cães soropositivos que convertem em soronegativos, mas ainda permanecem infectados” (GONTIJO, 2007).

Desta forma podemos observar que a PCR, por ser uma ferramenta sensível pode detectar infecção em cães soronegativos (GRAMICCIA et al., 2010; COURA-VITAL et al., 2013) além de permitir a quantificação da carga parasitária de maneira precisa e eficaz para confirmar o diagnóstico de leishmaniose nos animais. Os sistemas de PCR são bastante úteis, principalmente nos casos em que a sorologia é inconclusiva (SANTOS, 2018). A aplicação da PCR, em conjunto com a sorologia, pode contribuir para determinar a real extensão da infecção por *Leishmania* spp.

A ocorrência de casos humanos da LT está atrelada ao contato com os animais que permeiam os domicílios. Um estudo em Maringá-PR investigou 50 cães assintomáticos onde 12 (24,0%) tinham sorologia ou PCR positivas, e a positividade por IFI e PCR foi de 14,0%. Trinta e cinco animais eram de residências e oito deles (22,8%) tiveram testes laboratoriais positivos para LT. Os outros 15 eram cães errantes, sendo que quatro (26,7%) apresentaram PCR positiva, indicando essa potencial transmissão para o homem (PINTTNER et al., 2009).

Com os pontos abordados no estudo, podemos concluir, que os principais desafios para o enfrentamento da situação epidemiológica negligenciada da leishmaniose tegumentar são: a falta de uma compreensão abrangente sobre o comportamento do parasita *Leishmania*; a identificação de possíveis espécies hospedeiras, pois já se sabe que além dos cães, mamíferos selvagens, domésticos e peridomésticos já foram identificadas como portadores da infecção em várias regiões; a variabilidade de sinais clínicos em animais, além do grande número de hospedeiros assintomáticos (SUBRAMANIAN; SARKAR, 2018; ESCOBAR et al., 2019).

Nosso estudo torna-se inédito na avaliação de animais domésticos que incluem grupos como equinos, caprinos e felinos para leishmaniose tegumentar, uma vez que grande parte dos trabalhos descritos na literatura são voltados aos canídeos e para a forma visceral da doença. No presente momento existem limitações para referenciar

animais domésticos e peridomésticos envolvidos na transmissão de LT, por isso necessita de maiores investigações nesse assunto.

10 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos observou-se uma baixa prevalência nos cães do estudo. Apesar dos animais serem de área endêmica, como discutido anteriormente, o ELISA possui limitações quando se trata de estudos epidemiológicos, podendo ser explicado devido a reações inespecíficas, não produção de anticorpos ou ainda a não soroconversão nesses animais.

Referente as amostras biológicas, os leucócitos apresentaram melhor desempenho na identificação do DNA parasitário quando comparado ao *swab* conjuntival. Este evento é explicado em literatura devido ao comportamento do parasita em invadir células polimorfonucleares, facilitando sua detecção nesse grupo de células. O *swab* conjuntival possui potencial para identificar o parasito e sua utilização em campo é rápida e fácil. Entretanto, a conjuntiva não parece ser um local de trânsito da *L. (V.) braziliensis* necessitando de estudos mais aprofundados no tema.

A carga parasitária nos animais do estudo demonstra que mesmo assintomáticos esses animais tiveram contato com a *L. (V.) braziliensis* e possuíam DNA parasitário circulante. Ou seja, a informação obtida é que esses animais possuem potencial para serem hospedeiros da doença, podendo atuar como fonte de infecção para outros mamíferos.

A concordância entre os testes moleculares foi significativa, demonstrando que houve relação entre os resultados obtidos nos testes, contudo a PCR convencional não conseguiu identificar DNA do parasito, justificando a baixa concordância entre os testes. Apesar de ser uma técnica sensível, específica e estabelecida para leishmanioses a PCR convencional possui limitação principalmente em seu limite de detecção em 10 fg, desta forma, amostras abaixo deste limite não foram identificadas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, E. R. et al. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. **Parasitology**, Rio de Janeiro, v. 141, n. 14, p. 1891, 2014.
- AGUILAR, C. M. et al. Study of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in Venezuela: the role of domestic animals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Recife. p. 181-195, 1984.
- AGUILAR, C. M. et al. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 84, n. 1, p. 19-28, 1989.
- ALEXANDER, B. YOUNG, David G. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v. 87, n. 3, p. 397-403, 1992.
- ALENCAR, J. E. Um caso de leishmaniose tegumentar em *Equus asinus*. In: **XIV Congresso Brasileiro de Higiene**, Niterói, Brasil. 1959.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e35-671, 2012.
- ALVES, Y. R. et al. Leishmanioses e sua Importância em Saúde Pública. In: **Anais Colóquio Estadual de Pesquisa Multidisciplinar (ISSN-2527-2500) & Congresso Nacional de Pesquisa Multidisciplinar**. 2019.
- AL-ZAHRANI, M. A. et al. *Leishmania* infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 6. Cutaneous leishmaniasis of man in the south-west. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 5, p. 621-628, 1989.
- ANDRADE, B. et al. Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e Perspectivas. **Gazeta Médica da Bahia**, Rio de Janeiro, v. 74, n. 1, p. 8, 2008.
- ARMANDO, T. M. Aspectos gerais dos principais tratamentos para neoplasias palpebrais em cães. Trabalho de conclusão de curso. **Faculdade de Medicina Veterinária**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” 2017.
- BADARÓ, R. et al. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 35, n. 1, p. 72-78, 1986.
- BARBOSA, D.S. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Anim. Bras.** 11, 653–659.2010.

BARBOSA, V. T. et al. Detection of amastigote forms in a parasitological exam of smears made from conjunctival swab in dogs with visceral leishmaniasis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1465-1470, 2012

BASTOS, T.S.A. LINHARES, G.F.C; MADRID, D.M.C. Identificação morfológica de flebotomíneos capturados em área urbana. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 395-401, 2016.

BENASSI, J.C et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. **Experimental parasitology**, v. 177, p. 93-97, 2017.

BENVENGA, G.U. Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos no Estado de São Paulo. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.2013BOWMAN, I. B. R. Intermediary Metabolism of Pathogenic Flagellates. In: **Ciba Foundation Symposium 20-Trypanosomiasis and Leishmaniasis (with Special Reference to Chagas' Disease)**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 1974. p. 255-284.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. **Guia de vigilância em Saúde**. Brasília, 2017.p. 705.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRANDÃO-FILHO, S.P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 488-494, 1999.

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

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

BRILHANTE, A. F. et al. Leishmaniose tegumentar canina por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em um assentamento agrícola, área endêmica para leishmanioses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 4, p. 927-930, 2016.

BRITO, M. E. F. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, p. 425-429, 26 jul. 2012.

BRITO, M. E. F. et al. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of The Royal**

Society of Tropical Medicine and Hygiene, Oxford, v. 95, n. 2, p. 203–206, 1 mar. 2001.

BRITO, M.E.F. et al. Identification of Potentially Diagnostic *Leishmania braziliensis* Antigens in Human Cutaneous Leishmaniasis by Immunoblot Analysis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 7, n. 2, p. 318-321, 2000.

BRITO, M. E. F et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from the saliva of patients in a cutaneous leishmaniasis-endemic area of northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 4, 2018.

BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil: Species diversity of *Leishmania* parasites. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 1278–1286, out. 2009.

CAMARGO, L.M.A; BARCINSKI, M.A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003.

CASTRO, M.A.L. Classificação ontológica - normativa dos animais. **Revista Brasileira de Direito Animal**. Vol. 5. p. 160-161, 2009.

CASTRO, M.C.A.B de et al. **Caracterização imunofenotípica em linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana**. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. 2011

CERUTTI, P. H. et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar Americana: uma revisão de literatura. **Revista de Patologia do Tocantins**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 4, p. 55, 28 nov. 2017.

CRMV. **Manual Técnico de Leishmanioses Caninas**. Curitiba. Conselho Regional de Medicina Veterinária, 2015.

CONTER, C.C. **Deteção de *Leishmania (Viannia)* em polimorfonucleares e mononucleares no sangue de pacientes com leishmaniose tegumentar**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá. 2013.

CORVALAN, F. et al., DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Oxford v. 17, n. 1, p. 98–102, 2011.

COSTA, C.H.N. VIEIRA, J.B.F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.

COSTA, J.M.L et al. Estado atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão: II. Aspectos epidemiológicos, clínico-evolutivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. 2, p. 115-123, 1992.

COSTA, J. M. L. et al. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. Clinical modalities, diagnosis and therapeutic approach of the tegumentary leishmaniasis in Brazil. Rio De Janeiro, **Gazeta Médica da Bahia**, v. 1 n. 79, p. 14, 2009.

COURA-VITAL, W. et al. Risk factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from an endemic area of Brazil. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e71833, 2013.

COUTINHO, S.G. et al. Pathogenesis and immunopathology of leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 214-228, 1987.

DANTAS-TORRES, F. et al. Canine leishmaniasis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

DANTAS-TORRES, F. et al. Leishmaniose Felina: revisão de literatura. **Rev Clín Vet**, v. 61, p. 32-40, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.

DANTAS-TORRES, F. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio De Janeiro, v. 43, n. 6, p. 733-736, dez. 2010

DA COSTA-VAL, A.P. et al. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 636-643, 2007.

DHAOUADI, S. et al. Epidemiological survey of vector-borne infections in equids from northern Tunisia. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.** v. 37, p. 1021-1027, 2018.

DA ROCHA BRAGA, R. et al. Avaliação clínica e laboratorial de gatos domésticos colonizados no Campus do Pici da UFC: protocolo prático e de baixo custo para monitoramento sanitário. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, v. 12, n. 1, p. 64-86, 2018.

DA SILVA, A.V et al. the first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Trop.** 105 (1): 92-4, 2008.

DA SILVA SALES, K.G. et al. Fast multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of dog and human blood and *Leishmania* parasites in sand flies. **Parasites & vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2020

DE ALMEIDA FERREIRA, S. 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**, v. 6, n. 4, p. e1596, 2012.

DE ALMEIDA FERREIRA, S. et al. Evaluation of the conjunctival *swab* for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR–hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 257-263, 2008.

DE BRUIJN, M.H,L; BARKER, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta tropica**, v. 52, n. 1, p. 45-58, 1992.

DE LIMA, K.P.B. et al. Potencial de detecção da leishmaniose Tegumentar por testes moleculares em *swab* conjuntival de equinos assintomáticos em região metropolitana do recife, Pernambuco. **Anais 6º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica - O Enfrentamento da Covid-19**. p.91,2020.

DE PAIVA CAVALCANTI, M. et al. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. **Molecular and Cellular Probes**, London v. 27, n. 3–4, p. 122–128, jun, 2013.

DE SOUZA, Alda Izabel et al. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 128, n. 1-2, p. 41-45, 2005.

DISCH, J. et al. *Leishmania (Viannia)* subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 51, n. 3, p. 185-190, 2005.

DUARTE, M. C. et al. Proteins Selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an Immunoproteomic Approach with Potential Serodiagnosis Applications for Tegumentary Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, D.C, v. 22, n. 11, p. 1187–1196, nov. 2015.

ESCOBAR, T. A. et al. Assessment of *Leishmania infantum* infection in equine populations in a canine visceral leishmaniosis transmission area. **BMC veterinary research**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2019.

FAGUNDES-SILVA, G. A. et al. *Leishmania (Viannia) naiffi*: rare enough to be neglected? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 6, p. 797–800, set. 2015.

FALQUETO, A. et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 155-163, 1986.

FERNANDES, G.R et al. Aplicação de ferramentas moleculares para o diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana. **Projeto Gráfico e Editoração: Higor Costa de Brito**, p. 98. 2019.

FIGUEIREDO, F.B. et al. Avaliação sorológica para a detecção do anticorpo anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, município de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2009; (42): 141-5.

FREEMAN, K. American cutaneous leishmaniasis. London, Journal of the **Royal Army Medical Corps**, New York ,v. 129, n. 3, p. 167-173, 1983.

FURTADO, Tancredo. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **An Bras Dermatol**, Amsterdam v. 55, n. 2, p. 81-6, 1980.

FURTADO, T. A. Doenças Infecciosas com Manifestações Dermatológicas. Rio de Janeiro, **Editora Médica e Científica**, Rio de Janeiro, p. 319-338, 1994.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1169-1180, 2005.

GOMES, C. M. et al. Field Validation of SYBR Green- and TaqMan-Based Real- Time PCR Using Biopsy and Swab Samples To Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an Area Where *Leishmania (Viannia) braziliensis* is Endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 55, n. 2, p. 526–534, fev. 2017.

GOMES, C.M. **Acurácia da reação em cadeia da polimerase em amostras de saliva, swab nasal e papel filtro oral no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, revisão sistemática da literatura e meta-análise.** Tese - (Doutorado em Ciências Médicas), Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Brasília. p.43. 2014.

GOMES, P.I.S. et al. **Deteção da infecção por *Leishmania* spp., em gatos da Área Metropolitana de Lisboa, através de técnicas de diagnóstico serológico (IFI e ELISA) e de uma técnica molecular (qPCR) aplicada a células conjuntivais e a sangue.** Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária.2015.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, London v. 8, n. 4,p. 419–433, abr. 2010

GRAMICCIA, M. et al. Longitudinal study on the detection of canine *Leishmania* infections by conjunctival *swab* analysis and correlation with entomological parameters. **Veterinary parasitology**, v. 171, n. 3-4, p. 223-228, 2010.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. New York, **Nature Biotechnology**, v. 11, n. 9, p. 1026–1030, set.1993.

JUNIOR, A. B et al. Leishmanioses caninas. Manual técnico desenvolvido pelo CRMV em apoio com a **Universidade Federal do Paraná e Universidade Estadual de Londrina.** 2015. 44p. Disponível em: <https://www.crmv-56>

pr.org.br/uploads/publicacao/arquivos/Manual-tecnico-de-leishmanioses-caninas.pdf.
Acesso em: 19/03/2021.

JÚNIOR, N. F. L. et al. Epidemiology of canine leishmaniasis in southern Bahia, Brazil. **Acta tropica**, v. 148, p. 115-119, 2015.

KAUNITZ, J. D. The Discovery of PCR: Procurement of Divine Power. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 60, n. 8, p. 2230–2231, ago. 2015.

KUBISTA, Mikael et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.

LAINSON, R. et al. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson and Shaw, 1989. **Ann Parasitol Hum Comp.** 1990;65(5-6):282-4. PMID: 2097934.

LEITE, R. S. et al. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 201-206, 2010.

LIMA, B.S. et al. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in north-eastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. London. v. 107, p. 592-597, 2013.

LOPES, K.F C. et al. Urban Horses As Environmental Bioindicators for Leishmaniasis. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 2021.

LUCIANO, R. M. et al. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Chicago, v. 46, n. 3, p. 181, 1 jun. 2009.

MADEIRA, M. F. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 551-555, 2003.

MADEIRA, M. de F. et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, BRAZIL. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 5, p. 442-445, 2006.

MAIA, C. et al. Feline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. **Veterinary parasitology**, v. 174, n. 3-4, p. 336-340, 2010.

MANCIANTI, F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? **Parassitologia**, v. 46, n. 1-2, p. 203-206, 2004.

MANUAL TÉCNICO. Leishmanioses Caninas. **Universidade Federal do Paraná – Conselho Regional de Medicina Veterinária**. Paraná. 2015.

- MAZZA, S. Leishmaniosis tegumentaria y visceral. Bol. **Inst. Clín. Quirurg.** Buenos Aires, 2: 209-216, 1926.
- MENDONÇA, M. G. et al. Persistence of *Leishmania* Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure? **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, IL, v. 189, n. 6, p. 1018–1023, 15 mar. 2004.
- MONTENEGRO, J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. **Archives of Dermatology and Syphilology**, v. 13, n. 2, p. 187-194, 1926.
- NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M.A.S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, Rio de Janeiro v. 67, p. 7-19, 2010.
- NEVES, D.P; LINARDI, P. M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia humana**. 13ª. São Paulo: Atheneu, 2016
- OLIVEIRA, T.M.F.S. et al. Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 2, p. 220-222, 2015.
- OLIVEIRA, T.M.S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. Dissertação Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia, Portugal.p.111. 2010
- OPAS-OMS./Organização Pan-Americana da Saúde. Brasília: **Organização Pan-Americana da Saúde**, 2011.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Leishmaniasis**. 14 mar. 2019.
- PAIVA-CAVALCANTI, M.; REGIS-DA-SILVA, C.; GOMES, Y. Comparison of realtime PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Washington, v. 16, n. 4, p. 537–542, 2010.
- PASSOS, G. P. **Avaliação Soro-epidemiológica e Molecular de Cães Assintomática para Leishmaniose Tegumentar Americana em Área Endêmica** Dissertação- (Mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo. Espirito Santo. p. 25.2013.
- PHUMEE A, et al. Detection of *Leishmania siamensis* DNA in saliva by polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore, v. 89 (5) p.899-905, 2013.
- PILATTI, M. M. et al. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. **Research in veterinary science**, v. 87, n. 2, p. 255-257, 2009.
- PIRAJÁ, G.V et al. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, p. 203-216, 2013.
- PISANI, R.B.F et al. Hipotireoidismo congênito primário em cão: relato de caso. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 39, n. 4, p. 279-283, 2017.

PITTNER, E. et al. Ocorrência de leishmaniose tegumentar em cães de área endêmica no Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 561-565, 2009.

PORTELLA, M.F. et al. **Diagnóstico diferencial e comparativo através de métodos sorológicos e moleculares da infecção por *Leishmania* spp. em cães residentes na região oceânica de Itaipu, município de Niterói, Rio de Janeiro.** Tese de Doutorado. 2018.

POORNIMA, et al. Network pharmacology of cancer: From understanding of complex interactomes to the design of multi-target specific therapeutics from nature. **Pharmacological research**, London, v. 111, p. 290-302, 2016.

QUEIROZ, N. M. G. P et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010.

RAMOS, J.V.A. **Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar americana no distrito de Três Ladeiras, município de Igarassu, estado de Pernambuco.** Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. p.79. 2011.

RAMOS-VARA, J.A. et al. Cutaneous leishmaniasis in two horses. **Vet. Pathol.** 33, 731–734. 1996

RODRIGUES, E. H. G. et al. Evaluation of PCR for Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of Endemicity in Northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington v. 40, n. 10, p. 3572–3576, 2002

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, New York ,v. 7, n. 9, p. 581–596, set. 2007.

REY, L. **Bases da parasitologia médica.** Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan,2010.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. et al. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold spring harbor laboratory press, 1989

SANTOS, G.P.L et al. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 161-166, 2005.

SAVANI, E. S. et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 120, n. 3, p. 229-33, 2004.

SCHUBACH, T. M. P. et al. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 165-167, 2004.

SCHWARTZ, E.; HATZ, C.; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 6, n. 6, p. 342–349, jun. 2006.

SEBOLT, A.P.R. **Leishmaniose em pequenos animais: uma breve revisão**. Dissertação (Graduação em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos. p.27. 2018.

SHAW, J. J. et al. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Leishmania) shawi* in Pará state. **Annales de Parasitologie Humaine et Compare**, Paris, v. 66, n. 6, p.243-246, 1991.

SHAW JJ, LAINSON R. Ecology and epidemiology: New World. In: *The Leishmaniases in Biology and Medicine*. Peters W, Killick-Kendrick R (Eds). **Academic Press**, London, UK, v.1, p. 291–363, 1987.

SHIMABUKURO, P.H.F; GALATI, E.A.B. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotropica**, v. 11, p. 685-704, 2011.

SILVA, A.O da et al. **Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA alvo da reação em cadeia da polimerase na detecção de Leishmania (Viannia) spp.** Tese de Doutorado. 2017

SILVA, E.D. et al. Performance evaluation of anti-fixed *Leishmania infantum* promastigotes immunoglobulin G (IgG) detected by flow cytometry as a diagnostic tool for visceral Leishmaniasis. **Journal of immunological methods**, v. 469, p. 18-25, 2019.

SIMÕES-MATTOS, L. et al. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. **Veterinary parasitology**, v. 127, n. 3-4, p. 199-208, 2005.

SIMPSON, L. et al. Comparison of the mitochondrial genomes and steady state transcriptomes of two strains of the trypanosomatid parasite, *Leishmania tarentolae*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 7, p. e0003841, 2015.

SIRIYASATIEN et al. Early detection of novel *Leishmania* species DNA in the saliva of two HIV-infected patients. **BMC Infect Dis**, London, v.16, p. 89, 2016.

SOUZA, A.P et al. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. **PLoS One**, v. 8, n. 6, 2013.

SUBRAMANIAN, Abhishek; SARKAR, Ram Rup. Perspectives on *Leishmania* species and stage-specific adaptive mechanisms. **Trends in parasitology**, v. 34, n. 12, p. 1068-1081, 2018.

TEMPONI, A.O.D et al. Ocorrência de casos de leishmaniose tegumentar americana: uma análise multivariada dos circuitos espaciais de produção, Minas Gerais, Brasil, 2007 a 2011. **Cadernos de saúde pública**, Rio de Janeiro, v. 34, p.e00165716, 2018.

THOMAZ, C. et al. Comparison of parasite load by qPCR and histopathological changes of inner and outer edge of ulcerated cutaneous lesions of cutaneous leishmaniasis. **Plos one**, v. 16, n. 1, p. e0243978, 2021.

TOLEZANO, J. E. et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 3-4, p. 280-284, 2007.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, London, v.6, p. 750, 26 maio 2017.

VALENCIA et al. Non-invasive cytology brush PCR diagnostic and causative species identification of American cutaneous leishmaniasis in Peru. Amsterdam, **PLoS ONE**. v.7(11),p. 1-6 ,2012.

WALTON, B. C.; SHAW, J. J.; LAINSON, R. Observations on the *in vitro* cultivation of *Leishmania braziliensis*. **Journ Parasitol**, Lawrence, v. 6. p:1118-1119, 1977.

WEIGLE, K. SARAVIA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. **Clinics in dermatology**, v. 14, n. 5, p. 433-450, 1996.

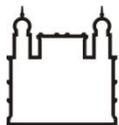
WINTER, P. C. Polymerase Chain Reaction (PCR). In: JOHN WILEY & SONS, LTD (Ed.). **Encyclopedia of Life Sciences**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. “**Leishmaniasis: Statistical Data**”. World Health Organization, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. “**Leishmaniasis**”. World Health Organization, 2019.

YOSHIDA, E. L. A. et al. Human, canine and equine (*Equus caballus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (= *L. braziliensis braziliensis*) in the south-west region of São Paulo State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 1, p. 133-134, 1990.

ZANZARINI, P. D et al. Leishmaniose tegumentar americana canina em municípios do norte do Estado do Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1957-1961, 2005.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

APÊNDICE**Apêndice 01****FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE CÃES**

Projeto: Avaliação sorológica e molecular de animais domésticos assintomáticos para leishmaniose tegumentar na região metropolitana de Recife.

DADOS DO PROPRIETÁRIO

NOME DO PROPRIETÁRIO _____

ENDEREÇO: _____ **Tel.:** _____

DADOS DO CÃO

NOME DO ANIMAL: _____

Raça: _____ **Idade** _____ **Sexo:** () M () F

Ectoparasitos: _____

DADOS CLÍNICOS

PORTE DO ANIMAL: () Pequeno () Médio () Grande

CASTRACÃO: () Sim () Não

CONDIÇÃO CORPORAL: () Caquético () Magro () Normal () Sobre peso () Obeso

GRAU: () 1 () 2 () 3 () 4 () 5

COMPRIMENTO DOS PÊLOS: () Curto () Longo

COR DOS PÊLOS: () Claro () Escuro () Misto

ALOPECIA: () Sim () Não

APRESENTAÇÃO () localizada () disseminada **GRAU:** 0 1 2 3

DERMATITE: () Sim () Não **Grau:** () 0 () 1 () 2 () 3

DESCAMAÇÃO FUFURÁCEA DA PELE: (seborreia) () Sim () Não

LESÕES DA PELE: () Sim () Não **LOCALIZAÇÃO:** _____ **GRAU:** 0 1 2 3

COLORAÇÃO MUCOSA OCULAR: () rósea () Pálida

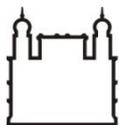
QUERATITE: () Sim () Não **ONICOGRIFOSE:** () Sim () Não

CONJUTIVITE: () Sim () Não **SECREÇÃO OCULAR:** () Sim () Não **GRAU:** 0 1 2 3

LINFADENOPATIA: () Sim () Não **Localização** _____

GRAU: 0 1 2 3

Responsável: _____ **Data:** ___ / ___ / ___



Apêndice 02

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Avaliação sorológica e molecular de animais domésticos assintomáticos para leishmaniose tegumentar na região metropolitana de Recife.

Eu, _____, RG _____, proprietário do cão _____ aceito que meu animal participe desse estudo, cujo objetivo é estudar a eco-epidemiologia da LT em área de colonização antiga, através da identificação dos casos autóctones da doença, caracterização da fauna de flebotomíneos vetores, reservatório doméstico e identificação da(s) espécie(s) de *Leishmania* envolvida(s). Fui informado que o meu cão terá seu sangue coletado para os testes de diagnóstico da leishmaniose tegumentar canina (LTC) no projeto acima referido. Fui orientado em relação aos benefícios desse estudo, que contribuirá para a busca de um diagnóstico mais seguro da leishmaniose tegumentar canina. Fui informado ainda que o material coletado seja incorporado ao Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, podendo ser utilizado em pesquisas posteriores. Fui informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão e que não serei ressarcido financeiramente para participar deste estudo.

Contatos: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho/Dra. Maria Edileuza Felinto de Brito,
IAM/FIOCRUZ-PE.

Fone: 21012500/2641

Recife, _____ de _____ de _____.

Responsável pelo cão

12 ARTIGO

Apêndice 03

Identificação de *L (V.) braziliensis* em animais domésticos e peridomésticos assintomáticos no Nordeste do Brasil

Karina Patrícia Baracho Lima¹, Claudio Júlio da Silva^{1,2}, Juliana Figueirêdo da Costa Lima Suassuna Monteiro¹, Andréa Karla Sales Ferreira da Silva¹, Fernando José da Silva¹, Allana Maria de Souza Pereira¹, Elis Dionisio da Silva, Cláudia Sofia de Assunção Gonçalves e Silva³, Valéria Pereira Hernandez¹, Sinval Pinto Brandão Filho¹, Maria Edileuza Felinto de Brito¹

¹Departamento de Imunologia, Laboratório de Imunoparasitologia (LIMP), ¹Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE; ¹Núcleo de Vigilância em Saúde de Moreno; ¹Setor de Ciências da Nutrição, Universidade Fernando Pessoa – UFP, Lisboa

ABSTRATC

In Moreno, Metropolitan Region of Recife, Pernambuco, the cutaneous leishmaniasis (LT) is highlighted for exhibiting important incidence, with a mean number of 52 cases of the disease registered yearly and 30% of prevalence. The disease is associated with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, main etiological agent from LTA in the state, connected to the identification of reservoir hosts and several species of varmint phlebotomine. Are considered LTA reservoirs the species of animals that maintain the circulation of *Leishmania* spp. in nature. Cases of natural infection by *L. (V.) braziliensis* are described in endemic areas in different regions of Brazil, dogs (*Canis familiaris*), domestic cats (*Felis catus*), horses (*Equus caballus*), donkeys (*Equus asinus*). The objective of this study is to perform the serological and molecular evaluation of asymptomatic domestic animals for LTA in the metropolitan region of Recife. 272 samples were collected from animals (canine, feline, equine and swine) residing around confirmed human clinical cases of LTA. The samples were obtained by convenience through blood collection and conjunctiva secretion (non invasive method), and 237 submitted to the immunological (ELISA) and molecular (conventional PCR and qPCR). The results obtained demonstrated that the agreement between leukocyte PCR and qPCR was significant with $p = 0.001$ and the ELISA of dogs only 05 positive animals, confirming that even animals with no apparent lesion can present *Leishmania* parasitic DNA. The collected data add relevant information to the role of domestic and peridomestic animals in the epidemiological cycle of tegumentary leishmaniasis.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis. Epidemiology. Reservoir. Molecular. Serology

Introdução

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença negligenciada de notificação compulsória e se caracteriza pelas formas clínicas que acometem a pele e mucosa. Essas diferentes manifestações da doença mostram-se relacionadas a diferentes espécies de *Leishmania* spp. e a resposta imunológica do hospedeiro (WHO, 2010).

A LT é endêmica em 75 países, onde 90% dos casos ocorrem nos países da Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2016; ALVAR et al., 2012). No Brasil a doença está presente em todo o país, com destaque na região nordeste, na qual Pernambuco é o terceiro Estado de maior prevalência (30%). Do total de casos no estado, 60% se concentram na Zona da Mata, sendo a *Leishmania (Viannia) braziliensis* a espécie predominante. (BRITO et al., 2009;2012;2018;BRANDÃO-FILHO et al.,2003 a).

Os métodos disponíveis para diagnóstico da LT, individualmente, não apresentam a eficácia e aplicabilidade desejada. Sendo assim, é necessário associar aspectos epidemiológicos, clínicos e a confirmação laboratorial dos casos, o que pode ser realizado através dos métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares (BRITO et al., 2012).

Nas Américas, os principais reservatórios de *Leishmania* sp. entre os mamíferos são os animais domésticos: cães, felinos, cavalos, jumentos, entre outros. Estes animais apresentam-se em sua maioria como assintomáticos, sendo considerados hospedeiros acidentais. Devido a estreita dependência humana, e durante processo de migração dessa população da área rural para outras localidades, há um aumento da exposição aos riscos de infecção e consequente manutenção do ciclo de

transmissão da doença (SILVA et al., 2001; DUARTE et al., 2010). Dentre os animais domésticos, os cães são os mais relatados na leishmaniose visceral como fonte de infecção para flebotomíneos em ambientes domésticos e peridomésticos (DANTAS-TORRES et al., 2007). Para LT há registro de outros animais como gatos domésticos (*Felis catus*) (DANTAS-TORRES et al., 2006; SAVANI et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2009) e equinos (*Equus caballus* e *Equus asinus*) como possíveis reservatórios. No Brasil os equinos não tem seu papel definitivamente esclarecido (BRASIL, 2010; BRANDÃO-FILHO et al., 2003), já na Venezuela são considerados reservatório peridoméstico de *L. braziliensis* (AGUILAR et al., 1984; BARBOSA et al., 2010).

Assim, o presente estudo propõe avaliar a potencial infecção por *L. (V.) braziliensis*, e avaliar diferentes métodos diagnósticos em animais domésticos assintomáticos para LT, a fim de contribuir para consolidação do conhecimento de possíveis reservatórios do parasito no ciclo de transmissão.

Material e Métodos

População de Estudo e amostras biológicas

A coleta dos cães foi realizada no período de janeiro de 2017 a janeiro de 2018, nas localidades do Engenho Jardim e Cumarú, municípios de Moreno, onde os tutores residiam. Para cada participante foi aplicado um questionário com objetivo da coleta de dados relacionados às principais variáveis epidemiológicas e caracterização da doença na população de estudo. Um total de 188 cães (*Canis familiaris*), foram avaliados e submetidos à coleta de sangue periférico por via endovenosa e

secreção conjuntival com *swab*. Além disso, amostras de sangue e secreção conjuntival de 9 gatos (*Felis catus*), 21 cavalos (*Equus f. caballus*), 08 burros (*Equus a. asinus*), 6 cabras (*Capra a. hircus*) foram cedidas pelo Serviço de Referência em Leishmanioses do IAM/FIOCRUZ-PE, totalizando 232 animais assintomáticos domiciliados nas mesmas localidades dos cães. As amostras estavam acondicionadas para posterior processamento no Laboratório de Imunoparasitologia - IAM/FIOCRUZ-PE. Os animais foram descritos como assintomáticos seguindo os critérios estabelecidos por MANCIANTI et al., 1988, onde os assintomáticos demonstram ausência de sinais e sintomas, referente a infecção por *Leishmania* spp.

Aspectos éticos

Todos os proprietários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do IAM/FIOCRUZ-PE, sob o número 115/2017 para os cães.

Critérios

Inclusão: Animais ausência de sinais e sintomas característicos da infecção por *Leishmania* spp cujos tutores permitiram a coleta de amostras biológicas e estas foram suficientes para realização dos testes.

Exclusão: Animais cujos tutores não permitiram a coleta de amostras biológicas; animais muito agressivos e que colocariam em risco a integridade física dos pesquisadores e de seus tutores ou animais cujas amostras biológicas foram insuficientes para os testes.

Obtenção do anel leucocitário e separação do plasma

O protocolo seguido para separação foi proposto por CASTRO (2011).

Extração de DNA

A extração de DNA dos leucócitos e *swab* conjuntival para purificação do DNA genômico foi realizada através do Kit comercial Qiagen (QIAmp DNA and Blood), de acordo com as instruções do fornecedor. Foi realizada curva de diluição para avaliar a sensibilidade de detecção de DNA de *Leishmania (V) braziliensis* utilizando a cepa de referência (IOC-566-MHOM/BR/75/M2903). O DNA foi diluído em série nas concentrações de 10ng/L a 1fg/ μ L.

Testes Moleculares

As amostras de DNA provenientes de leucócitos e *swab* conjuntival foram submetidas à PCR em tempo real conforme descrito por PAIVA-CAVALCANTI (2013). Este sistema utiliza o kDNA como alvo de detecção à região variável do minicírculo do cinetoplasto de *Leishmania (V.) braziliensis*, amplificando um fragmento de 138 pb. Todas as amostras foram testadas em duplicata, com controles positivos e negativos (sem DNA de *Leishmania braziliensis*). Para PCR convencional foi realizada tendo como alvo de detecção também o kDNA do parasito, equivalente a 750 pb, de acordo com as condições descritas por De Bruijn e Barker (1992).

Obtenção de promastigosta e extrato solúvel de *Leishmania (V.) brasiliensis*

As alíquotas de culturas das formas promastigotas da L (V.) *braziliensis*, foram obtidas a partir da cepa de referência (MHOM/BR/75/M2903). Estas foram mantidas *in vitro*, expandidas em meio Schneider's e acompanhadas até que fosse atingido a fase exponencial de crescimento. Em seguida os parasitos foram retirados do sobrenadante e houve lavagem em solução salina tamponada contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), por

três vezes, O sedimento formado foi resuspenso em paraformaldeído a 1%, depois incubado por 24 horas a 4°C. Ao término da incubação os parasitos foram novamente lavados entretanto em SFB 3% duas vezes. Por fim, uma alíquota foi retirada e contada em câmara de Neubauer. As formas promastigotas mantidas *in vitro* foram transferidos para tubos Falcon estéril e submetidos a centrifugação de 400 X g por 10 min, na etapa seguinte foram realizadas sucessivas lavagens (3x) com solução salina tamponada, 1x e pH 7.2 e o pellet formado foi resuspenso com 750µL da solução tampão de lise branda e 250µL de inibidor de protease. O conteúdo formado foi transferido para microtubos de 1,5mL e em seguida foram realizados sucessivos congelamentos e descongelamentos com o objetivo de lise celular em nitrogênio líquido e banho Maria 36°C, respectivamente. A solução foi centrifugada a 10.000 X g a 4°C por 15 min e os antígenos solúveis coletados no sobrenadante, quantificados com reagente de Bradford (10µL da suspensão antigênica, 200µL de Bradford e 790µL de água deionizada), alíquotados em microtubos de 1,5mL e congelados a -80 °C para posterior utilização.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O ensaio de ELISA foi realizado seguindo o protocolo desenvolvido *in house* por SILVA et al., (2019). O protocolo sofreu ajustes onde houve a utilização de anti-dog IgG (gamma chain specific) conjugado a peroxidase e fração de antígenos solúveis da espécie *L. (V.) braziliensis*.

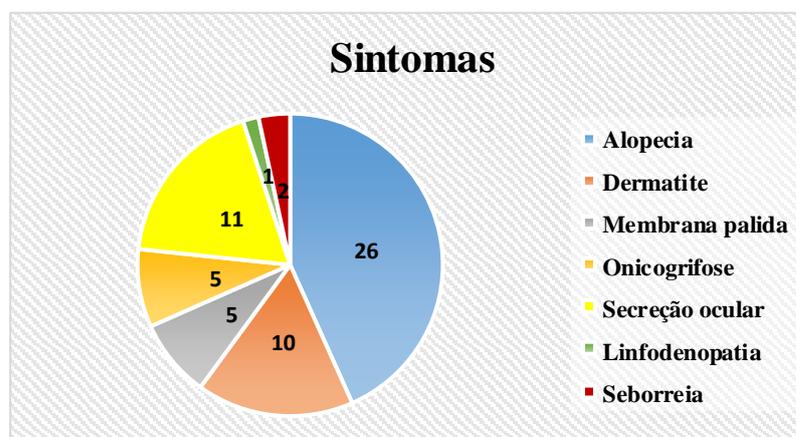
Análise Estatística

O banco de dados para inserção dos resultados foi construído utilizando o programa estatístico SPSS 20.0 para análises de frequências e razões de prevalência. O programa MedCalc Software Ltd 2021 foi utilizado para realizar os testes de comparação de proporções e do qui-quadrado de Campbell (2007) e Richardson (2011). Para todas as análises, as conclusões foram tomadas em nível de significância de 5%.

Resultados

Nesse estudo foram coletadas amostras de 272 animais domésticos separados em cinco espécies (*Canis familiaris*, *Felis catus*, *Equus caballus*, *Equus asinus*, *Capra hircus*). A maioria dos animais era do sexo masculino (61,8%), e a média de idade de 4.13 anos (± 3.0). Após análise do questionário e do médico veterinário foram observados os seguintes sintomas descritos no gráfico 01 em animais da população de estudo:

Gráfico 01. Sintomas sugestivos de leishmaniose tegumentar nos animais domésticos



Desta forma foram incluídos no estudo 232 animais que não possuíam nenhum dos sintomas descritos acima, sendo: 188 cães, 21 cavalos, 09 gatos, 08 burros, 06 cabras. Devido ao critério de exclusão aplicado, a quantidade de amostras nos testes foi variada. Segue abaixo fluxograma aplicado no estudo.

Curva de diluição de DNA genômico de *L. (V.) braziliensis*

A curva de diluição de *L. (V.) braziliensis* foi realizada utilizando-se a cepa de referência (IOC-566-MHOM/BR/75/M2903) e obteve uma detecção máxima de 10 fg para PCR convencional. Na PCR em tempo real obteve-se uma eficiência de 98% com limite de detecção de 1fg de DNA de *L. (V.) braziliensis*.

PCR em Tempo Real (Leucócitos)

Para PCR em tempo real (qPCR) os resultados das amostras de leucócitos demonstraram pico específico para *L. V. braziliensis* de 81,03 °C, variando entre 79 °C e 82 °C para espécie (Figura 11). A amplificação das amostras de leucócito dos animais domésticos encontra-se descrito abaixo. Das cinco espécies analisadas foram positivos para técnica as seguintes porcentagens: *Canis*

familiaris 68,2%, *Felis catus* 100%, *Equus caballus* e *Equus asinus* 77,3%, *Capra hircus* 50% .

Swab conjuntival

Em relação às amostras de swab conjuntival, o gráfico de amplificação encontram-se abaixo. Os resultados dos animais positivos em relação às espécies seguem: *Canis familiaris* 68,2%, *Felis catus* 100%, *Equus caballus* e *Equus asinus* 77,3%, *Capra hircus* 50%.

PCR Convencional (Leucócitos)

Na PCR convencional duas amostras obtiveram amplificação em 750 pb para técnica, e pertenciam a espécie *Canis familiaris*, com frequência porcentual de 2,05%. As demais espécies não foram detectáveis.

Swab conjuntival

Para amostras de swab conjuntival não houve amplificação para técnica de PCR convencional em nenhuma delas.

Identificação de *L. (V.) braziliensis* nos testes moleculares por espécie

Canis familiaris

A detecção de *L. (V.) braziliensis* em amostras cães demonstram uma maior

positividade quando aplicada a técnica de qPCR em combinação com amostras de leucócitos 68,2%.

Felis catus

Nos felinos a detecção da *L. (V.) braziliensis* utilizando a técnica de qPCR em junção com amostras de leucócitos se mostrou 100% positiva, enquanto a PCR convencional não houve detecção do parasito. Para *swab* conjuntival os resultados positivos e não detectados foram respectivamente 41,7% e 58,3%.

Equus caballus /Equus asinus

As amostras de leucócitos em relação a qPCR em equinos obteve-se uma positividade de 77,3% enquanto para PCR convencional não foram identificados DNA de *L. (V.) braziliensis*. Para *swab* conjuntival a qPCR obteve positividade de 30,8% e não foi identificado em 69,2%.

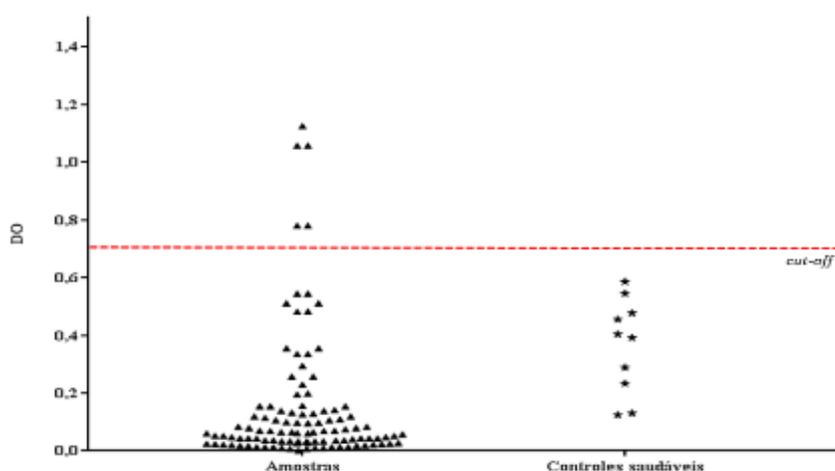
Capra hircus

Para os caprinos as porcentagens de positivos e não identificados foram igualmente de 50%. Para PCR convencional os leucócitos obtiveram 33,3% de positividade e 66,7% das amostras não houve identificação do parasito. Em 100% das amostras de *swab* conjuntival também não houve identificação.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Os testes de ELISA foram realizados com o objetivo de verificar a prevalência na população de estudo e estão descritos no gráfico 1. Foram realizados com 115 cães obtendo-se um limiar de 0,689 de soroprevalência para *L. braziliensis*, 10 animais saudáveis foram utilizados como controles negativos. Dos 115 plasmas de cães incorporados ao teste, 5 foram positivos, ultrapassaram o limiar de 0,689.

Prevalência para infecção por *L. braziliensis* em *Canis familiaris*



Teste de concordância KAPPA

O teste de concordância de Kappa entre PCR convencional e qPCR para leucócitos obteve um índice de 1%, $p=0,001$ (significante). O cruzamento das amostras foi concordante em 02 animais da espécie *Canis familiaris*, obteve-se uma baixa concordância entre os testes. Para *swab* conjuntival não foi possível realizar a concordância entre as técnicas pois não foi obtido nenhum resultado positivo para *Leishmania* spp na PCR convencional.

DISCUSSÃO

A Leishmaniose tegumentar é uma doença infecto-parasitária que possui uma ecoepidemiologia capaz de estabelecer diversos ciclos de transmissão que envolve uma variedade de reservatórios e vetores, a depender de cada região. A participação dos animais domésticos no ciclo epidemiológico da LT nas Américas é descrita na literatura desde o início do século (WEIGLE; SARAIVA, 1996; BRANDÃO-FILHO et al., 1999; BEVENGA, 2013).

Os autores BRUMPT, E & PEDROSO, A. (1913) foram os primeiros a registrarem infecção natural em cães, além disso, diversos trabalhos relatam os jumentos, cavalos e gatos como fonte de infecção frequente por *Leishmania* spp. (AGUILAR et al., 1984, DELGADO et al., 1997; BRESCIANI et al., 2010).

A infecção por *Leishmania* spp. nos animais pode cursar de forma assintomática, oligossintomática ou sintomática. Nos cães, que são os animais mais relatados na literatura, é observado cerca de 60% de assintomáticos e os sinais clínicos podem demorar de meses a anos para se manifestar após a infecção. Quando esses sintomas se desenvolvem, eles ocorrem primariamente como lesão cutânea evoluindo para sistêmica (FALQUETO et al., 1986; BRILHANTE

et al., 2017). No estudo, as manifestações clínicas mais frequentes foram alopecia, secreção ocular e dermatite, que são sinais inespecíficos para diversas infecções (PISANI et al 2017., ARMANDO ., 2017; DA ROCHA BRAGA et al., 2018). A lesão compatível com LT é o marcador de animal sintomático. No entanto, a associação de alguns sintomas clínicos também pode estar diretamente relacionada à infecção por LT, mesmo que o animal não tenha desenvolvido (ainda) lesão.

A PCR convencional apresentou positividade menor do que na qPCR nas amostras biológicas de sangue e *swab* conjuntival utilizadas. Isso pode ser explicado devido a variação do protocolo utilizado nos dois sistemas. Diversos fatores influenciam na melhor capacidade de detecção de DNA em um sistema molecular, tais como: o método de extração, os *primers* iniciadores, o tipo de amostra clínica utilizada e o tempo de infecção em cada animal, que interfere na carga parasitária. O tipo de coleta das amostras biológicas é um dos fatores importantes para induzir resultados melhores ou não (PORTELA., 2018).

O método de coleta por *swab* revela-se um aliado no diagnóstico da *Leishmania* spp. O potencial da coleta não invasiva de diversas amostras clínicas como o *swab* conjuntival, nasal, oral, e pele de orelha para o diagnóstico molecular utilizando a PCR convencional e qPCR (DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2008; 2012) revela um bom desempenho para ambas as técnicas a partir de animais assintomáticos. Constatou-se que este procedimento pode ser utilizado para diagnóstico em casos sem sintomatologia da doença (LEITE et al., 2010).

Quanto ao ELISA, a infecção por *L. (V.) braziliensis* na sorologia foi observada em 5 cães, 4.34% (5/115). A técnica avaliou a infecção pelo patógeno a partir do plasma sanguíneo. Atualmente, segundo a nota técnica conjunta No 01/2011 – CGDT – CGLAB/DEVIT/SVS/MS, o diagnóstico

sorológico para cães preconizado pelo Ministério da Saúde é o teste imunocromatográfico denominado “TR DPP® Bio-Manguinhos”, que é usado como exame de triagem, e o teste ELISA indireto como exame confirmatório (JUNIOR et al 2015).

Apesar do ELISA ser referência para os cães, uma limitação da técnica deve-se à difícil distinção entre infecção recente ou antiga pela titulação dos anticorpos, além de reações cruzadas. Antígenos de superfície e antígenos dos microtúbulos do citoesqueleto do protozoário são comuns a todos os tripanosomatídeos o que justifica a ocorrência de reação cruzada entre eles (BADARÓ et al., 1986; LUCIANO, 2009).

Com os pontos abordados no estudo, podemos concluir, que os principais desafios para o enfrentamento da situação epidemiológica negligenciada da Leishmaniose são: a falta de uma compreensão abrangente sobre o comportamento do parasita *Leishmania*; a identificação de possíveis espécies hospedeiras, pois já se sabe que além dos cães, mamíferos selvagens, domésticos e peridomésticos já foram identificadas como portadores da infecção em várias regiões; a variabilidade de sinais clínicos em animais, além do grande número de hospedeiros assintomáticos (SUBRAMANIAN; SARKAR, 2018; ESCOBAR et al., 2019).

Nosso estudo torna-se inédito na avaliação de animais domésticos que incluem grupos como equinos, caprinos e felinos para leishmaniose tegumentar, uma vez que grande parte dos trabalhos descritos na literatura são voltados aos canídeos e para a forma visceral da doença. No presente momento existem limitações para referenciar animais domésticos e peridomésticos envolvidos na transmissão de LT, por isso necessita de maiores investigações nesse assunto.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos tutores dos animais pela disponibilidade em contribuir com a pesquisa, ao apoio financeiro da FACEPE (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) e a infraestrutura do IAM- FIOCRUZ PE (Instituto Aggeu Magalhães).

REFERÊNCIAS

AGUILAR, C. M. et al. Study of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in Venezuela: the role of domestic animals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, p. 181-195, 1984.

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

ALEXANDER, B. YOUNG, David G. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 3, p. 397-403, 1992.

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

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, San Francisco v. 7, n. 5, p. e35-671, 31 maio 2012.

ALVES.Y.R et al. Leishmanioses e sua Importância em Saúde Pública. In: **Anais Colóquio Estadual de Pesquisa Multidisciplinar (ISSN-2527-2500) & Congresso Nacional de Pesquisa Multidisciplinar**. 2019.

ANDRADE, B. et al. Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e

Perspectivas. **Gazeta Médica da Bahia**, Rio de Janeiro v. 74, n. 1, p. 8, 27 Maio 2008.

ARMANDO, T.M. Aspectos gerais dos principais tratamentos para neoplasias palpebrais em cães. Trabalho de conclusão de curso. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” 2017.

BARBOSA, D.S. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Anim. Bras.** 11, 653–659.2010.

BARBOSA, V. T. et al. Detection of amastigote forms in a parasitological exam of smears made from conjunctival swab in dogs with visceral leishmaniasis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1465-1470, 2012

BASTOS, T.S.A. LINHARES, G.F.C; MADRID, D.M.C. Identificação morfológica de flebotomíneos capturados em área urbana. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 395-401, 2016.

BENVENGA, G.U. **Ocorrência de Leishmania spp. em cães, gatos e equinos no Estado de São Paulo**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.2013

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. **Guia de vigilância em Saúde**. Brasília, 2017.p. 705.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRANDÃO-FILHO, S.P. et al. Epidemiological surveys confirm an

increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 488-494, 1999.

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

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

BRESCIANI, K.D.S et al. Ocorrência de *Leishmania* spp. em felinos do município de Araçatuba, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, p. 127-129, 2010.

BRILHANTE, A. F. et al. Leishmaniose tegumentar canina por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em um assentamento agrícola, área endêmica para leishmanioses.**Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 4, p. 927-930, 2016.

BRITO, M. E. F. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, p. 425–429, 26 jul. 2012.

BRITO, M. E. F. et al. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis.

Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Oxford, v. 95, n. 2, p. 203–206, 1 mar. 2001.

BRITO, M.E.F. et al. Identification of Potentially Diagnostic *Leishmania braziliensis* Antigens in Human Cutaneous Leishmaniasis by Immunoblot Analysis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 7, n. 2, p. 318-321, 2000.

BRITO, M. E. F et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from the saliva of patients in a cutaneous leishmaniasis-endemic area of northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 4, 2018.

BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil: Species diversity of *Leishmania* parasites. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 1278–1286, out. 2009.

CAMARGO, L.M.A; BARCINSKI, M.A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003.

CASTRO, M.A.L. Classificação ontológica - normativa dos animais. **Revista Brasileira de Direito Animal**. Vol. 5. p. 160-161, 2009.

CASTRO, M.C.A.B de et al. **Caracterização imunofenotípica em linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana**. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. 2011

CERUTTI, P. H. et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar Americana: uma revisão de literatura.

Revista de Patologia do Tocantins, Rio de Janeiro, v. 4, n. 4, p. 55, 28 nov. 2017.

CRMV. **Manual Técnico de Leishmanioses Caninas**. Curitiba. Conselho Regional de Medicina Veterinária, 2015.

CONTER, C.C. **Detecção de *Leishmania (Viannia)* em polimorfonucleares e mononucleares no sangue de pacientes com leishmaniose tegumentar**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá. 2013.

CORVALAN, F. et al., DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Oxford v. 17, n. 1, p. 98–102, 2011.

COSTA, C.H.N. VIEIRA, J.B.F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.

COSTA, J.M.L et al. Estado atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão: II. Aspectos epidemiológicos, clínico-evolutivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. 2, p. 115-123, 1992.

COSTA, J. M. L. et al. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no brasil clinical modalities, diagnosis and therapeutic approach of the tegumentary leishmaniasis in brazil. Rio De Janeiro, **Gazeta Médica da Bahia**, v. 1 n. 79, p. 14, 2009.

COUTINHO, S.G. et al. Pathogenesis an immunopathology of leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 214-228, 1987.

DANTAS-TORRES, F. et al. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

DANTAS-TORRES, F. et al. Leishmaniose Felina: revisão de literatura. **Rev Clín Vet**, v. 61, p. 32-40, 2006.
SOUZA, A.P et al. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. **PLoS One**, v. 8, n. 6, 2013.

TEMPONI, A.O.D et al. Ocorrência de casos de leishmaniose tegumentar americana: uma análise multivariada dos circuitos espaciais de produção, Minas Gerais, Brasil, 2007 a 2011. **Cadernos de saúde pública**, Rio de Janeiro, v. 34, p.e00165716, 2018.

THOMAZ, C. et al. Comparison of parasite load by qPCR and histopathological changes of inner and outer edge of ulcerated cutaneous lesions of cutaneous leishmaniasis. **Plos one**, v. 16, n. 1, p. e0243978, 2021.

TOLEZANO, J. E. et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 3-4, p. 280-284, 2007.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, London, v.6, p. 750, 26 maio 2017.

VALENCIA et al. Nono-invasive cytology brush PCR diagnostic and causative species identification of American cutaneous leishmaniasis in Peru. Amsterdam, **PLoS ONE**. v.7(11),p. 1-6, 2012.

WALTON, B. C.; SHAW, J. J.; LAINSON, R. Observations on the *in vitro* cultivation of *Leishmania braziliensis*. **Journ Parasitol**, Lawrence, v. 6. p:1118-1119, 1977.

WEIGLE, K. SARAIVIA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. **Clinics in dermatology**, v. 14, n. 5, p. 433-450, 1996.

WINTER, P. C. Polymerase Chain Reaction (PCR). In: JOHN WILEY & SONS, LTD (Ed.). **Encyclopedia of Life Sciences**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. “**Leishmaniasis: Statistical Data**”. World Health Organization, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. “**Leishmaniasis**”. World Health Organization, 2019.

ANEXO

Anexo 01


 Ministério da Saúde
 FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Aggeu Magalhães

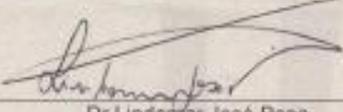
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado "Eco-epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana em Áreas de colonização Antiga na Região Metropolitana do Recife - PE, Brasil." protocolado sob nº 115/2017 pelo (a) pesquisador (a) **María Edileuza Felinto de Brito** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM) em reunião **27/09/2017**. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 03 de outubro de 2021 com a finalidade de pesquisa científica. Os cães são advindos de domicílios localizados no Estado de Pernambuco e os hamsters são advindos do Biotério de criação do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE. É responsabilidade do coordenador do projeto notificar à CELIA de quaisquer alterações em relação ao projeto. O coordenador concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

| Quantitativo de Animais Aprovados | |
|--|--|
| Espécie/Linhagem/Raça | Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo |
| Cão/ canis familiaris/(N/A) | 200 /Amostra de conveniência/ machos e fêmeas |
| Hamster / Mesocricetus Auratus/ Sírio ou Golden | 120 (Até 200 gr/ média de 4 semanas/ machos e fêmeas) |
| Total | 320 |

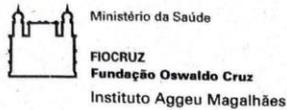
Recife (PE, Brasil), 03 de outubro de 2017


 Dr Lindomar José Pena
 Coordenador CEUA/IAM

Lindomar José Pena
 Coordenador de Comissão de Ética no Uso de Animais - CELIA
 Matr. Supl: 2375435
 e-mail: Lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br
 IAM / FIOCRUZ

Av. Professor Moraes Filho, s/n - Cidade Universitária - Campus de UFPE
 Recife - PE - CEP: 50.670-420
 Telefones: (81) 2101-2502/2101-2500 Fax: (81) 3453-1911
 www.cpqam.fiocruz.br

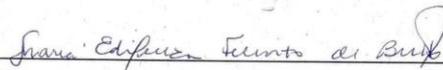
Anexo 02



CARTA DE ANUÊNCIA

O Serviço de Referência em Leishmanioses, concorda em disponibilizar amostras de *swabs* e sangue (leucócitos e plasmas) de animais domésticos (gato, cavalo, jumento, burro, ovelha e cabra), de área endêmica de leishmaniose tegumentar, para o desenvolvimento do projeto intitulado: **Avaliação sorológica e molecular de animais domésticos assintomáticos para leishmaniose tegumentar em área da Região Metropolitana de Recife**, sob a orientação do Dr. Sinval Pinto Brandão Filho.

Recife, 10 de abril de 2019.



Dra. Maria Edileuza Felinto de Brito

Vice coordenadora do SRL-IAM/FIOCRUZ-PE

Maria Edileuza F. de Brito
Pesquisadora em Saúde Pública
Dist. SAPE 447411 / Dolo de Imunologia
Chefe do LIMP - CPqAM / FioCruz