

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PROVA DE CONCEITO PARA AVALIAR A
AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR *LOOP* (LAMP-K26) NO
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

por

Thabata Santos Garcia

Belo Horizonte

2023

DISSERTAÇÃO MCS-IRR

T. S. GARCIA

2023

THABATA SANTOS GARCIA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PROVA DE CONCEITO PARA AVALIAR A
AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR *LOOP* (LAMP-K26) NO
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito ao curso de Mestrado em Ciências da Saúde – área de concentração Doenças Infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis.

Orientação: Dr. Gustavo Fontes Paz
Coorientação: Dr. Daniel Moreira de Avelar

Belo Horizonte

2023

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB 6 3740

G165d Garcia, Thábata Santos.
2023

Desenvolvimento de uma prova de conceito para avaliar a amplificação isotérmica mediada por LOOP (Lamp-K26) no diagnóstico de Leishmaniose visceral canina / Thábata Santos Garcia. – Belo Horizonte, 2023

XVI, 102 f., il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 88-102

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis.

1. Leishmaniose 2. Diagnóstico molecular/técnicas 3. Leishmania infantum/patogenicidade I. Título. II. Paz, Gustavo Fontes (Orientação). III. Avelar, Daniel Moreira de (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.93

THABATA SANTOS GARCIA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PROVA DE CONCEITO PARA AVALIAR A
AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR *LOOP* (LAMP-K26) NO
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito ao curso de Mestrado em Ciências da Saúde – área de concentração Doenças Infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis.

Banca Examinadora

Dr. Gustavo Fontes Paz - IRR/FIOCRUZ MINAS - Presidente

Dra. Erika Michalsky Monteiro- IRR/FIOCRUZ MINAS - Titular

Dr. Vitor Márcio Ribeiro – HVSA - Titular

Dissertação Defendida e Aprovada em Belo Horizonte aos 19/05/2023

“Nós, seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar.”

Chico Xavier.

Dedico este trabalho aos animais, nossos irmãos menores, que me ensinam todos os dias sobre o amor sem limites.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente em minha vida, guiando-me através dos caminhos que escolhi, pelo suporte nos momentos de dificuldade, acalmando meu coração nos dias mais difíceis, e por colocar pessoas especiais na minha vida!

Agradeço imensamente aos meus orientadores, Dr. Gustavo Fontes Paz e Dr. Daniel Moreira de Avelar, pela confiança, apoio e oportunidade de realizar um grande sonho. Vocês me permitiram um aprendizado único e me demonstraram que o ato de orientar vai além de atribuições técnicas, passando também pelo cuidado, preocupação e empatia. Vocês me inspiram!

À minha mãezinha pelo amor incondicional, você é meu grande exemplo de vida! Graças a você, ao seu apoio, cuidado e ensinamentos eu cheguei até aqui! Ao papai (*in memorian*) pelo amor e pelo exemplo de paixão pelo trabalho. Ao Tio Doca pelos ensinamentos, parceria, conselhos e por tanto carinho!

Ao amor da minha vida, Paulo Henrique, por sempre apoiar meus sonhos e minhas decisões. Por todo o seu amor, cuidado, paciência e por me fazer tão feliz e realizada! Você me inspira diariamente!

Aos meus irmãos, Bárbara e Igor, e a Solange por sempre me apoiarem e se fazerem presentes ao longo dessa jornada, me estimulando a prosseguir e alcançar meus objetivos. Dinda Márcia e Angélica (*in memorian*), Marco, Padins Tonin e Gutinho, Arthur (príncipe da dinda), Bentinho, Catinha, Henri, Igor, Paloma, Luiza, Lucas, Isabela, Matheus, Cau, Ti Fernando, Tânia, Aline, Diogo e Bib's, cada um de vocês é parte fundamental desta conquista!

A todos os meus familiares que acompanharam minha paixão por cuidar dos animais desde criança! Incluindo todos os meus 18 tios e tias por parte de mãe, aos meus mais de 20 primos de primeiro grau e mais alguns de segundo e mais uns de terceiro... Amo vocês!

Aos meus professores, Vítor Márcio Ribeiro e Flávia Clare, vocês são grandes exemplos para minha vida profissional e pessoal. Graças a vocês, essa minha curiosidade inquietante não se apaga, refletindo em longas horas de estudo e na busca incansável para me tornar uma profissional cada vez mais

capacitada e uma pessoa cada vez melhor!

Às minhas amigas, Bela e Monikita, pelo apoio, carinho e conselhos fundamentais para essa vitória! Letícia, Anna, Marina, Thays, Tina e Flávia, minhas amigas e companheiras nos momentos de alegria e tristeza, nos estudos, projetos, pesquisas, congressos e loucuras!

Aos meus alunos do 6º período de medicina veterinária da UNIFEMM, recadinho do coração: tia ama vocês! Obrigada por me inspirarem a me tornar uma profissional cada vez mais capacitada!

À Clínica de Especialidades Veterinárias Bem Cuidar, meu projeto profissional que chegou tão longe. Aos meus pacientes, clientes e a Cintia, vocês são parte fundamental dessa vitória!

À FIOCRUZ e aos amigos na instituição, Lara, Célia, Carol, Leco e Felipe, por me receberem de forma tão acolhedora para realização deste projeto.

À CAPES pela concessão da bolsa e suporte financeiro ao nosso projeto de pesquisa.

Cada um de vocês é parte fundamental na realização deste trabalho e na concretização deste sonho. Gratidão!

“A leishmaniose é uma doença de cão e daqueles que vivem uma vida de cão”

Joaquim de Alencar

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) zoonótica é causada por protozoários da espécie *Leishmania infantum* e os cães são os principais reservatórios em áreas urbanas. O correto diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) é fundamental no controle da LV, evitando a permanência de animais infectados como fonte de infecção para vetores. Técnicas sorológicas para diagnóstico da LVC apresentam limitações quanto à sensibilidade e especificidade, enquanto técnicas moleculares apresentam maior complexidade de realização e custo mais elevado. Nesse contexto, a amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) surge como uma ferramenta diagnóstica de maior aplicabilidade, sem necessidade de equipamentos complexos, com custo reduzido e rapidez na entrega de resultados. Este estudo propôs o desenvolvimento de uma prova de conceito para avaliar a LAMP-K26 no diagnóstico da LVC e foi composto por duas etapas complementares, realizadas em um abrigo de cães no município de Vespasiano, Minas Gerais. A primeira etapa determinou a soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania* pelos testes TR DPP® e ELISA IDEXX, a taxa de positividade pelo PCR/kDNA e PCR-RFLP/*hsp70* e ITS-1 em fragmentos de pele e a soroconversão de cães após três meses pelo teste ELISA IDEXX. Na segunda etapa, foi montado um painel dividido em dois grupos: (i) não caso, com 15 amostras com resultados sorológicos não reagentes e moleculares negativos da primeira etapa, e (ii) caso, com 28 amostras com resultados sorológicos reagentes e moleculares positivos, recuperadas do banco do Grupo de Estudos em Leishmanioses (GEL) do Instituto René Rachou. A soroprevalência foi de 39,7% no TR DPP® e 8,6% no ELISA IDEXX, a concordância entre os testes foi de 62,1% e a soroconversão pelo teste ELISA IDEXX foi de 55%. A taxa de positividade dos testes moleculares foi de 46,9% (PCR/kDNA), 3,1% (PCR-RFLP/*hsp70*) e 37,5% (PCR-RFLP/ITS-1). A LAMP-K26 foi capaz de detectar até 100fg de DNA de *L. infantum*, após 30 minutos de reação, e não amplificou DNA de outras espécies de *Leishmania*, com sensibilidade de 96,4%, especificidade de 93,3% e acurácia de 95,4%. Este é o primeiro estudo de avaliação da LAMP-K26 no diagnóstico da LVC e nossos resultados demonstraram uma excelente performance para detecção molecular de DNA de *L. infantum* em pele de cães, abrindo perspectivas de novos estudos com maior número amostral, diferentes tipos de amostras e, preferencialmente, prospectivos.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular. Pele. Cães.

ABSTRACT

Zoonotic visceral leishmaniasis (VL) is caused by protozoa of the *Leishmania infantum* species and dogs are the main reservoirs in urban areas. The correct diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) is fundamental in the control of VL, avoiding the permanence of infected animals as a source of infection for vectors. Serological techniques for diagnosing CVL have limitations in terms of sensitivity and specificity, while molecular techniques are more complex and costly. In this context, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) emerges as a diagnostic tool with greater applicability, without the need for complex equipment, with reduced cost and quick delivery of results. This study proposed the development of a proof of concept to evaluate LAMP-K26 in the diagnosis of CVL and consisted of two complementary steps, carried out in a dog shelter in the municipality of Vespasiano, Minas Gerais. The first step determined the seroprevalence of anti-*Leishmania* antibodies by the TR DPP® and ELISA IDEXX tests; the positivity rate by PCR/kDNA and PCR-RFLP/*hsp70* and ITS-1 in skin fragments; and the seroconversion of dogs after three months by the IDEXX ELISA test. In the second stage, a panel was assembled divided into two groups: (i) non-case, with 15 samples with non-reagent serological and negative molecular results from the first stage, and (ii) case, with 28 samples with positive serological and molecular results, retrieved from the database of the Leishmaniasis Study Group (GEL) at the René Rachou Institute. The seroprevalence was 39.7% in the TR DPP® and 8.6% in the ELISA IDEXX, the concordance between the tests was 62.1% and the seroconversion by the ELISA IDEXX test was 55%. The positivity rate of the molecular tests was 46.9% (PCR/kDNA), 3.1% (PCR-RFLP/*hsp70*) and 37.5% (PCR-RFLP/ITS-1). LAMP-K26 was able to detect up to 100fg of *L. infantum* DNA, after 30 minutes of reaction, and did not amplify DNA from other *Leishmania* species, with a sensitivity of 96.4%, specificity of 93.3% and accuracy of 95.4%. This is the first evaluation study of LAMP-K26 in the diagnosis of CVL and our results demonstrated an excellent performance for molecular detection of *L. infantum* DNA in dog skin, opening perspectives for new studies with a larger sample number, different types of samples and, preferably, prospective.

Keywords: Molecular diagnosis. Skin. Dogs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Os ciclos de transmissão das leishmanioses zoonóticas.	18
Figura 2 - Ilustração de uma peça de cerâmica (<i>huaco</i>) em comparação com a lesão nasal de um paciente com LC.	22
Figura 3 - Estrutura representacional das DTN's e contexto socioeconômico.	23
Figura 4 - Endemia Mundial de LV.	24
Figura 5 - Formas evolutivas de protozoários do gênero <i>Leishmania</i>	26
Figura 6 - Demonstração esquemática do ciclo de vida de protozoários do gênero <i>Leishmania</i>	28
Figura 7 – <i>Lu. longipalpis</i> fêmea realizando repasto sanguíneo.	29
Figura 8 - Potenciais reservatórios silvestres de <i>L. infantum</i> no território brasileiro.	31
Figura 9 - Possibilidades de resultados da infecção por <i>L. infantum</i> na espécie canina.	33
Figura 10 - Kit TR-DPP®.	36
Figura 11 - Dispositivo TR-DPP®.	37
Figura 12 - SNAP® <i>Leishmania</i> – ELISA IDEXX.	39
Figura 13 - Acionamento do dispositivo SNAP® <i>Leishmania</i> - ELISA IDEXX.	39
Figura 14 - Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. visualizadas por microscopia em objetiva 100x com coloração hematológica rápida.	40
Figura 15 - Etapas da técnica PCR convencional.	42
Figura 16 - Ciclos da técnica PCR convencional.	43
Figura 17 - Sequências das regiões de gene alvo.	46
Figura 18 - Representação da etapa não cíclica da LAMP.	47
Figura 19 - Representação da etapa cíclica da LAMP.	48
Figura 20 - Método de detecção visual do ponto final da reação LAMP.	49
Figura 21 - Detecção de DNA de <i>L. infantum</i> pela LAMP.	50
Figura 22 - Fluxograma do estudo.	53
Figura 23 - Município de Vespasiano, Minas Gerais.	54
Figura 24 - Cães de um abrigo no município de Vespasiano, Minas Gerais.	55
Figura 25 - Coleta de sangue canino.	56
Figura 26 - Kit TR DPP®.	57
Figura 27 - Resultado positivo no TR DPP®.	57
Figura 28 - Kit ELISA IDEXX (SNAP® <i>Leishmania</i> IDEXX).	58
Figura 29 - Resultado positivo no kit SNAP® <i>Leishmania</i> (ELISA IDEXX).	59
Figura 30 - Coleta de fragmento de pele em cão via <i>punch</i> (5mm).	60
Figura 31 - Frasco contendo fragmento de pele coletado de cão em RNA Later.	60
Figura 32 - Localização dos <i>primers</i> LAMP no gene K26 do complexo <i>L. donovani</i>	63
Figura 33 – Banho-maria utilizado na reação LAMP-K26.	64
Figura 34 - Visualização dos resultados da reação LAMP-K26, por meio de alteração de cor da amostra.	65
Figura 35 - Fotodocumentação de gel de agarose 2% da PCR convencional (kDNA).	70
Figura 36 - Fotodocumentação de gel de agarose 2% da PCR convencional (<i>hsp70</i>).	71

Figura 37 - Fotodocumentação de gel de agarose 2% da PCR convencional (ITS-1).	72
Figura 38 - Fotodocumentação de gel de agarose 2% da PCR-RFLP (<i>hsp70</i>).....	73
Figura 39 - Fotodocumentação de gel de agarose 2% da PCR-RFLP (ITS-1).....	74
Figura 40 - Visualização dos resultados do ensaio LAMP-K26 e eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos da reação, para avaliação de limite de detecção para DNA de <i>L. infantum</i>	77
Figura 41 - Visualização dos resultados do ensaio LAMP-K26 e eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos da reação para avaliação de especificidade analítica, com diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados dos testes sorológicos em amostras de soro canino sem sinais clínicos de LVC no dia 0.....	69
Tabela 2: Resultados de PCR convencional (alvos kDNA, <i>hsp70</i> e ITS-1) e PCR-RFLP (alvos <i>hsp70</i> e ITS-1) em amostras provenientes de cães sem sinais clínicos de LVC e não reagentes no TR DPP® e ELISA IDEXX.....	75
Tabela 3: Comparação de resultados da LAMP-K26, em amostras com diferentes concentrações de <i>L. infantum</i> , em três tempos de reação.....	76
Tabela 4: Avaliação de sensibilidade analítica da LAMP-K26.....	78
Tabela 5: Resultados dos testes moleculares e reação LAMP-K26 nas amostras do grupo não caso.....	79
Tabela 6: Resultados dos testes moleculares e reação LAMP-K26 nas amostras do grupo caso.....	80
Tabela 7: Desempenho do teste LAMP-K26 no diagnóstico de LVC.....	81
Tabela 8: Análise de concordância dos testes moleculares em amostras com resultados sorológicos não reagentes.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

B3: *Outer Primer B3*

BIP: *Backward Inner Primer*

Bst DNA: DNA do *Bacillus stearothermophilus*

CEELVA: Comissão Encarregada do Estudo da Leishmaniose Visceral Americana

CEUA: Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Fundação Oswaldo Cruz

DAT: Teste de Aglutinação Direta

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DTN's: Doenças Tropicais Negligenciadas

EIE-LVC: Kit ELISA Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos

ELISA IDEXX: SNAP® *Leishmania* IDEXX

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

F3: *Outer Primer F3*

FIP: *Forward Inner Primer*

GEL: Grupo de Estudos em Leishmanioses - Fiocruz

HAEIII: Enzima de Restrição HAEIII

HASPB: *Hydrophilic Acylated Surface Protein B*

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HSP's: Proteínas de Choque Térmico

HSP70: Família de Proteínas de Choque Térmico 70

hsp70: Gene Codificador *hsp70*

IFAT: Teste Fluorescência Indireta de Anticorpos

IHC: Imunohistoquímica

IOC: Instituto Oswaldo Cruz

IRR-Fiocruz Minas: Instituto René Rachou Fiocruz Minas

ITS-1: Espaçador Transcrito Interno

K26: Proteína de Superfície K26

kDNA: DNA Cinetoplasto

LAMP: Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop*

LBP: *Loop Primer*

LC: Leishmaniose Cutânea

LCM: Leishmaniose Mucocutânea

LFP: *Loop Primer*

LV: Leishmaniose Visceral

LVC: Leishmaniose Visceral Canina

LV-HIV: Coinfecção *Leishmania* Visceral e Vírus da Imunodeficiência Humana

MS: Ministério da Saúde

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCLV: Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

qPCR MULTIPLEX: Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa com Múltiplos Alvos

RFLP: Análise de Polimorfismo de Fragmentos de Restrição

rK26: Proteína de Fusão k26

rK39: Proteína de Fusão k39

RMBH: Região Metropolitana de Belo Horizonte

RNA: Ácido Ribonucleico

SFM: Sistema Fagocítico Mononuclear

SBCAL: Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SRD: Sem Raça Definida

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TR DPP®: Teste Rápido Imunocromatográfico Plataforma Dual-Path

UV: Ultravioleta

UVZ: Unidades de Vigilância em Zoonoses

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Epidemiologia das leishmanioses	22
2.2 Leishmaniose Visceral humana	24
2.3 Agente etiológico.....	25
2.4 Ciclo biológico da <i>L. infantum</i>	27
2.5 Reservatórios da <i>L. infantum</i>	29
2.6 LVC	32
2.7 Diagnóstico da LVC	34
2.7.1 Diagnóstico Sorológico	35
2.7.1.1 TR-DPP®.....	36
2.7.1.2 ELISA	38
2.7.1.3 Diagnóstico Parasitológico	40
2.7.1.4 Molecular.....	42
2.8 LAMP	45
2.8.1 Aspectos gerais	45
2.8.2 Metodologia LAMP.....	46
3 OBJETIVOS.....	51
3.1 Objetivo geral.....	51
3.2 Objetivos específicos	51
4 MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1 Considerações éticas.....	52
4.2 Delineamento do estudo	52
4.3 Etapa 1 - Pesquisa de anticorpo anti- <i>Leishmania</i> e detecção de DNA de <i>Leishmania</i> em cães sem sinais clínicos de doença.....	54
4.3.1 Área de estudo	54
4.3.2 População de Estudo.....	54
4.3.3 Coleta e processamento de amostras de sangue.....	55
4.3.4 Soroprevalência e soroconversão entre os cães do abrigo	56
4.3.4.1 TR DPP®.....	57
4.3.4.2 ELISA IDEXX	58
4.3.5 Detecção de DNA e identificação da espécie de <i>Leishmania</i> entre os cães com sorologia não reagente	59

4.3.5.1 PCR convencional	60
4.3.5.2 PCR-RFLP	61
4.4 Etapa 2 - Padronização e avaliação da acurácia da LAMP-K26 no diagnóstico da LVCan	62
4.4.1 LAMP-K26	62
4.4.2 Padronização da reação LAMP-K26.....	63
4.4.3 Limite de detecção.....	65
4.4.4 Especificidade analítica	65
4.4.5 Avaliação de acurácia e concordância entre testes moleculares.....	66
4.4.6 PCR quantitativa.....	66
4.5 Análise de Dados	67
5 RESULTADOS	69
5.1 Soroprevalência e soroconversão em cães de abrigo	69
5.2 Detecção de DNA de <i>Leishmania</i> e caracterização em cães com sorologia não reagente.....	69
5.3 Limite de detecção, especificidade analítica e tempo de reação da LAMP-K26	76
5.4 Prova de conceito, carga parasitária e análise de concordância	79
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

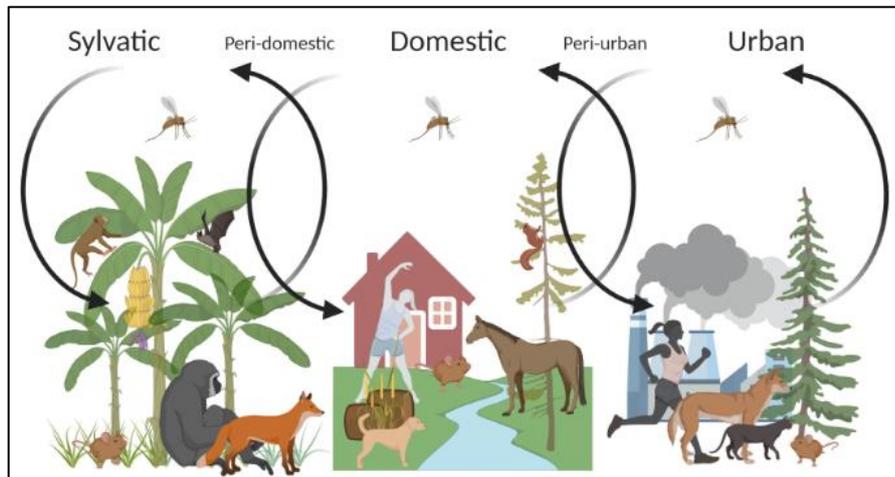
As leishmanioses são enfermidades, inseridas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), no grupo das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN's), que afetam principalmente as populações mais empobrecidas de diversas regiões do mundo e têm recursos limitados para pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos e metodologias diagnósticas. Nas Américas, as leishmanioses são um grave problema de saúde pública devido à sua magnitude, ampla distribuição geográfica e morbimortalidade (OPAS 2022).

São causadas por espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada de flebótomos fêmeas infectadas para humanos e outros mamíferos, podendo se apresentar sob três formas principais: leishmaniose cutânea (LC), a forma mais comum; leishmaniose visceral (LV), a forma mais grave e leishmaniose mucocutânea (LCM), a forma mais incapacitante da doença (OMS, 2023).

Atualmente, a OMS estima que mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para as leishmanioses, com conseqüente risco de infecção. Aproximadamente 30.000 novos casos de LV e mais de 1 milhão de novos casos de LC são notificados anualmente (OMS, 2023).

Nas Américas, a LV tem caráter zoonótico, é causada pela espécie *Leishmania infantum* e transmitida para humanos e outros mamíferos pela picada de vetores flebotomíneos, principalmente pela espécie *Lutzomyia longipalpis*. No meio urbano, os cães (*Canis lupus familiaris*) são considerados os principais reservatórios do parasito (Figura 1) (Oliveira *et al.*, 2013; OPAS, 2019; Werneck, 2014).

Figura 1 - Os ciclos de transmissão das leishmanioses zoonóticas.



FONTE: HONG *et al.* (2020)

No Brasil, a LV está presente em praticamente todos os estados, com 1.683 casos notificados em 2021, e contribui com mais de 90% dos casos notificados de toda a América. A prevalência da doença no Brasil varia de 1,9% a 35% e, nos últimos anos, a taxa de letalidade apresentou aumento gradativo, passando de 3,1% em 2000 para 7,1% em 2012 (Brasil 2021; OMS 2019; OMS 2020; OPAS 2019).

Com o objetivo de reduzir as taxas de letalidade, morbidade e o risco de transmissão da doença, as autoridades brasileiras implementaram o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), que propõe diversas medidas a serem adotadas pelos municípios, como vigilância epidemiológica, diagnóstico precoce e tratamento de casos humanos, controle químico dos vetores, educação em saúde e controle do reservatório canino (Brasil, 2014).

Dentre as ações direcionadas à espécie canina, a eutanásia de animais sororreagentes vem sendo amplamente questionada quanto à sua eficácia e impacto na expansão da doença no país. Diversos fatores são apontados para o baixo impacto dessa medida, como a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC); o longo intervalo entre diagnóstico e eutanásia; a rápida reposição de animais, muitas vezes por outros mais suscetíveis; e a baixa aceitação de responsáveis em entregar seus animais, principalmente após a liberação do tratamento canino com o princípio ativo miltefosina em 2016 (Brasil, 2016; Courtenay, *et al.*, 2002).

Em 2021, visando a revisão das ações propostas pelo PCLV e uma abordagem da LV baseada na Saúde Única, o Brasil se tornou o primeiro país do mundo a adotar

o encoleiramento em massa de cães como medida pública de controle da LV, investindo mais de R\$ 16 milhões na aquisição de coleiras com deltametrina a 4% para distribuição em municípios com alto risco de transmissão da LV que aderirem ao programa (Brasil, 2021).

Diante dessa nova realidade, a qual proporciona uma abordagem integrada e multidisciplinar da situação epidemiológica da LV, repensar as medidas propostas para a espécie canina é de fundamental importância, dado o inquestionável papel social destes animais na sociedade moderna e estreita relação com humanos (Dantas-Torres *et al.*, 2019; Michalsky *et al.*, 2007).

Entre 2018 e 2020, o Instituto Pet Brasil coordenou um levantamento da população de animais em situação de vulnerabilidade (aqueles que vivem sob tutela de famílias classificadas abaixo da linha da pobreza ou nas ruas) chegando a dados alarmantes: os números quase dobraram, com aumento de 3,9 para 8,8 milhões e, do total, 69,4% eram cães (IPB, 2022). Em paralelo a essa situação, o número de abrigos que acolhem essa população de cães vem crescendo a cada ano, porém, a falta de dados e políticas públicas direcionadas a tais locais dificulta a implementação de medidas que garantam a saúde e o bem-estar dos animais acolhidos (Galdioll, *et al.*, 2022).

Do ponto de vista epidemiológico, a LVC assume especial importância no controle da LV, uma vez que sua prevalência é maior em áreas endêmicas (Laurenti *et al.*, 1996), devido ao intenso parasitismo cutâneo observado em cães, à consequente fonte de infecção para flebotomíneos, à proximidade da espécie canina com humanos e à reconhecida precedência da LVC em relação à ocorrência de casos em humanos (Alvar *et al.*, 2012).

Visando o controle de casos em humanos, as autoridades brasileiras realizam o diagnóstico de LVC pelo teste rápido imunocromatográfico plataforma Dual-Path (TR DPP®; Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), como triagem, e o ensaio Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) como teste confirmatório e indicação de eutanásia de cães sororreagentes (Brasil, 2014). Entretanto, as taxas de sensibilidade e especificidade desse protocolo diagnóstico levanta diversos questionamentos sobre a confiabilidade dos resultados (Paz *et al.*, 2018; Travi *et al.*, 2018).

É amplamente reconhecido que as metodologias sorológicas utilizadas no diagnóstico da LVC possuem limitações na precisão de resultados, uma vez que o estado clínico dos animais infectados e a consequente produção de anticorpos possuem muitas variações e podem alterar com o estadiamento da infecção (Arruda *et al.*, 2013; Figueiredo *et al.*, 2018; Paz *et al.*, 2018). Além disso, é bem reconhecido a limitação desses métodos em distinguir entre infecções passadas e presentes, bem como a ocorrência de reações cruzadas com outros agentes infecciosos, como *Trypanosoma cruzi* e outras espécies de *Leishmania* (Morales-Yuste *et al.*, 2022).

A LVC apresenta um amplo espectro clínico de doença que está diretamente relacionado ao tipo de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro frente ao parasito, porém, é importante ressaltar que cães infectados, com sinais clínicos presentes ou não, desempenham papel relevante na transmissão de *L. infantum* para flebótomos, servindo como importante fonte de infecção silenciosa (Albuquerque *et al.*, 2017; Laurenti *et al.*, 1996).

Atualmente, metodologias moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), são consideradas as formas mais eficazes para o diagnóstico da LVC, apresentando alta sensibilidade e especificidade, o que possibilita resultados mais precisos e confiáveis em comparação com métodos sorológicos (Albuquerque *et al.*, 2017). Porém, o alto custo, a inaplicabilidade a campo, a falta de padronização e os diversos alvos utilizados levam a limitações do uso da PCR, principalmente em inquéritos caninos (Marcelino *et al.*, 2020).

Recentemente, o uso de técnicas moleculares mais acessíveis vem sendo amplamente pesquisado para diagnóstico de diversas infecções, dentre elas a amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP), uma ferramenta promissora para substituição de protocolos complexos e pouco acessíveis atualmente em uso (NOTOMI, *et al.*, 2000).

Desenvolvida por Notomi *et al.* (2000), a LAMP possui altas taxas de sensibilidade e especificidade, comparáveis à PCR. Além disso, é rápida na entrega de resultados (aproximadamente uma hora), tem custo reduzido, é robusta, tem fácil reprodutibilidade e execução, além de ser realizada em condições isotérmicas, dispensando uso de equipamentos complexos como o termociclador.

A falta de testes diagnósticos eficazes e com aplicabilidade fora de ambientes hospitalares ou laboratórios, em áreas endêmicas, é uma barreira crítica para o

tratamento e controle eficaz das leishmanioses, em humanos e animais. O desenvolvimento de um ensaio LAMP, voltado para o diagnóstico da LVC, pode fornecer uma nova e importante ferramenta para clínicas/hospitais veterinários e laboratórios de Unidades de Vigilância em Zoonoses (UVZ) de municípios brasileiros com estrutura e recursos limitados (Nzeli, *et al.*, 2019).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são enfermidades que acompanham a humanidade ao longo de sua história. Diversas civilizações, em diferentes regiões do mundo, possuem relatos de moléstias que se assemelham às suas manifestações clínicas. No Velho Testamento, em Êxodo 9:10, é relatado o aparecimento de feridas que se arrebatavam em úlceras em homens e animais. Em 2000 a.C., os egípcios, descreveram um tipo de doença de pele nominada “botão do Nilo” (Benchimol e Junior, 2020).

Nas Américas, objetos datados do período pré-colombiano, 400 a 900 anos d.C., retratavam pessoas com mutilações em lábios e nariz (Figura 2) de forma muito similar às manifestações clínicas de LC (Lainson e Shaw, 1988; Lainson, 2010).

Figura 2 - Ilustração de uma peça de cerâmica (*huaco*) em comparação com a lesão nasal de um paciente com LC.



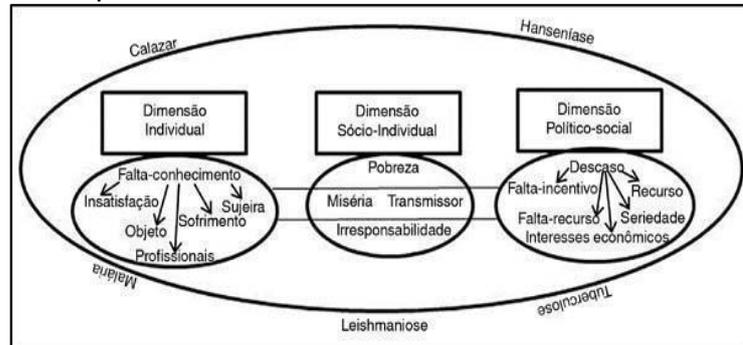
FONTE: http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/hist_rico.htm

No século X, árabes islâmicos provenientes da atual região de fronteira entre Afeganistão e Rússia, identificaram a “úlceras de Balkh” e, já naquela época, a população nativa local associava essa moléstia a picadas de insetos (Benchimol e Junior, 2020).

As leishmanioses estão inseridas no grupo de DTN’s e, embora diversificadas do ponto de vista etiológico, médico e epidemiológico, essas enfermidades apresentam uma importante característica em comum: estão associadas a populações empobrecidas e vulneráveis de diferentes regiões do mundo (Figura 3),

impactando negativamente os índices de desenvolvimento humano, a saúde pública local e frustrando economias de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (OMS, 2010).

Figura 3 - Estrutura representacional das DTN's e contexto socioeconômico.



FONTE: SANTOS *et al.* (2017)

Devido à variedade de espécies de parasitos e às diferentes interações com o sistema imune do hospedeiro, as leishmanioses manifestam-se sob diferentes formas clínicas: visceral, considerada a mais grave e com taxas de mortalidade que podem chegar a 90%, quando não tratada; e tegumentar, com suas manifestações cutânea e mucocutânea, considerada a forma mais comum da doença, mas com caráter social profundamente estigmatizante, decorrente das severas deformações físicas que podem ocorrer em pessoas acometidas (OMS, 2020; Brasil, 2014).

No Brasil, a LV foi apontada como problema de saúde pública em 1934, quando o Serviço Cooperativo de Febre Amarela criou um laboratório na Bahia para analisar fragmentos de fígado, provenientes de viscerotomia de óbitos suspeitos de febre amarela. Na ocasião, o patologista Henrique Penna identificou protozoários do gênero *Leishmania* em lâminas de pacientes negativos para febre amarela, encontrando 41 óbitos relacionados à LV (Penna, 1934).

Em junho de 1936, foi criada a Comissão Encarregada do Estudo da Leishmaniose Visceral Americana (CEELVA), chefiada por Evandro Chagas. Os esforços desse grupo resultaram em diversas publicações, na segunda metade da década de 1930, sobre vários aspectos da LV no país (Benchimol *et al.*, 2019).

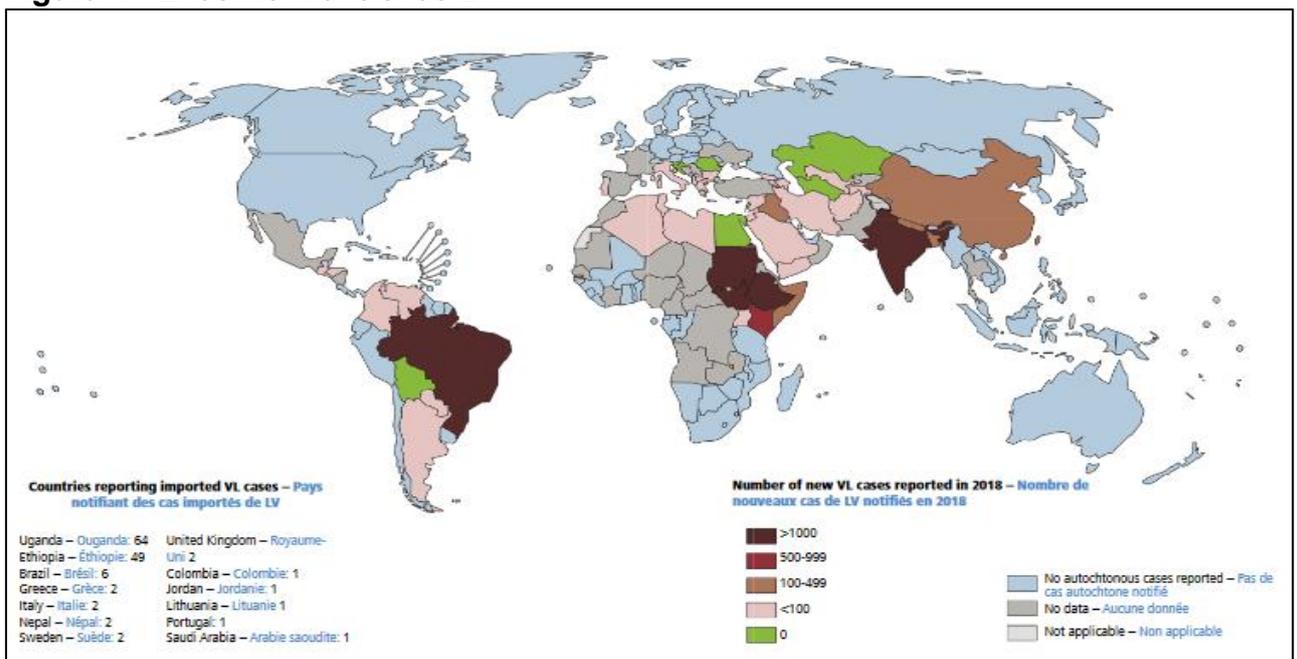
Desde o final do século XX, as leishmanioses reemergiram em zonas rurais e urbanas no Brasil e em outros países, apresentando um perfil de expansão geográfica para áreas anteriormente consideradas livres. Diversos fatores são apontados para esse novo perfil epidemiológico, como mudanças climáticas/ambientais, migrações

humanas, crescimento urbano caótico, aumento da incidência da LVC e outros processos socioeconômicos (Benchimol *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2001).

2.2 Leishmaniose Visceral humana

Para monitorar a situação mundial da LV, a OMS avalia periodicamente diversos indicadores da doença, em países e regiões de todo mundo, registrando os casos notificados, a endemicidade da doença, a quantidade de casos importados e a taxa de letalidade. Atualmente, as Américas, a África Oriental e do Norte, a Ásia Ocidental e o Sudeste Asiático são considerados endêmicos para a doença (Figura 4) (Ruiz-Postigo *et al.*, 2020).

Figura 4 - Endemia Mundial de LV.



FONTE: RUIZ-POSTIGO, (2020)

Nas Américas, a LV está presente em 12 países e, no período de 2001 a 2017, foram registrados 59.769 novos casos, resultando uma média de 3.516 casos por ano (OPAS, 2019). No Brasil, são notificados cerca de 1600 casos de LV anualmente, com coeficiente de incidência de 2,0 casos/100.000 habitantes (Brasil, 2021; OPAS, 2022).

Nos últimos anos, a letalidade brasileira decorrente dessa doença vem aumentando gradativamente, passando de 3,1% em 2000 para 7,1% em 2012 (Brasil,

2014). Em 2019, 97% (2.529) dos casos notificados nas Américas eram provenientes do Brasil (OPAS, 2022).

Além disso, desde a década de 1980, observa-se progressiva urbanização da LV no Brasil, anteriormente caracterizada como doença tipicamente rural, e associada a bolsões de pobreza característicos do nordeste do país. As condições precárias de vida existentes nas periferias das cidades, vivenciadas pela população brasileira a partir da década de 1970, a migração de pessoas e animais para os centros urbanos e as mudanças climáticas contribuíram para o processo de transição epidemiológica da doença, com a transferência de perfis de morbimortalidade característicos do meio rural para o ambiente urbano (Bevilacqua *et al.*, 2001).

Simultânea à urbanização da LV, a interiorização da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a coinfeção LV-HIV vêm chamando a atenção dos órgãos públicos de saúde brasileiros em razão de sua magnitude, transcendência, expansão geográfica e aumento dos índices de letalidade em pacientes acometidos (Sousa-Gomes *et al.*, 2011).

Em 2014, o Ministério da Saúde (MS) divulgou o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, com objetivo de orientar e atender às necessidades de implementação de ações para controle, prevenção e redução da transmissão e morbimortalidade da doença. Dentre as medidas adotadas, estão o diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos; a eutanásia de cães sororreagentes; o uso de inseticidas residuais para controle do vetor; a vigilância epidemiológica; a gestão ambiental e a educação em saúde (Brasil, 2014; Rocha *et al.*, 2020).

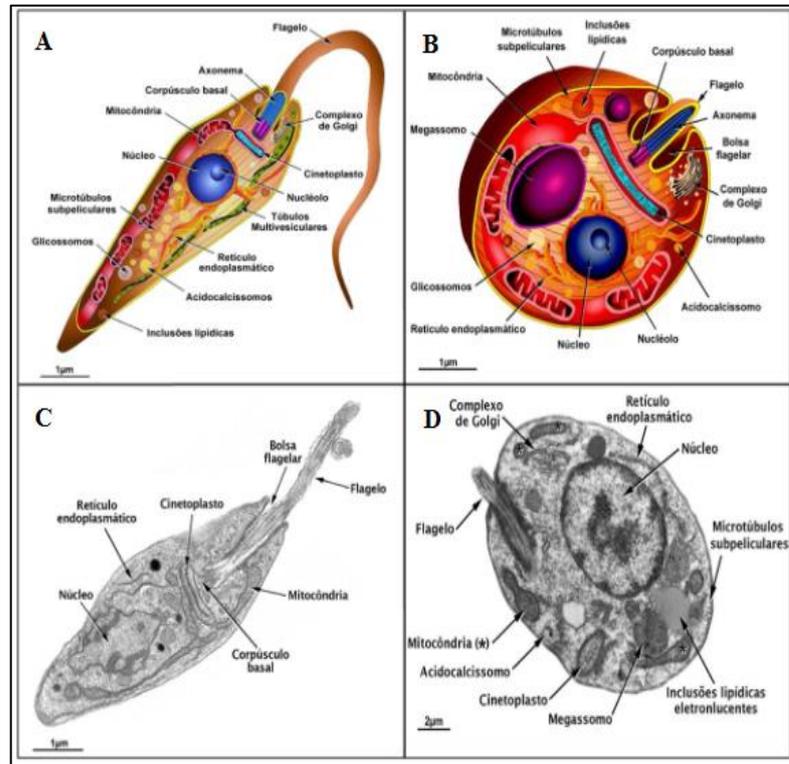
2.3 Agente etiológico

As leishmanioses são causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Esses parasitos são caracterizados pela presença do cinetoplasto, estrutura presente dentro da mitocôndria, com material genômico, denominado kDNA, e responsáveis pela codificação de diversas proteínas mitocondriais e RNA ribossomal (Lukes *et al.*, 2014).

Organismos do gênero *Leishmania* são heteroxênicos e possuem dois estágios de vida: forma promastigota (Figura 5A e 5C), com presença de flagelo, no hospedeiro

invertebrado, e a forma amastigota (Figura 5B e 5D), parasita intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), no hospedeiro vertebrado (NEVES *et al.*, 2007).

Figura 5 - Formas evolutivas de protozoários do gênero *Leishmania*.



FONTE: TEIXEIRA *et al.* (2013)

O gênero *Leishmania* é dividido em 3 subgêneros: *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania* (Tsokana *et al.*, 2014). O subgênero *Leishmania* está presente no Velho e no Novo Mundo, tendo como principais espécies *L. donovani*, *L. amazonensis* e *L. infantum*. Já o subgênero *Viannia* está distribuído exclusivamente na região tropical das Américas, tendo como principal espécie *L. braziliensis* (Bates, 2007) e ainda *L. guyanensis*. O subgênero *Sauroleishmania* compreende as espécies não patogênicas para os humanos, sendo encontradas principalmente em répteis (Raymond *et al.*, 2012).

Na América Latina, na região Mediterrânea e na Europa, a LV é causada pela espécie *L. infantum* e transmitida de mamíferos para humanos pela picada de flebotomíneos infectados; na África e na Índia, o agente etiológico é *L. donovani*, transmitida de humanos para humanos pelos vetores (Ready, 2014).

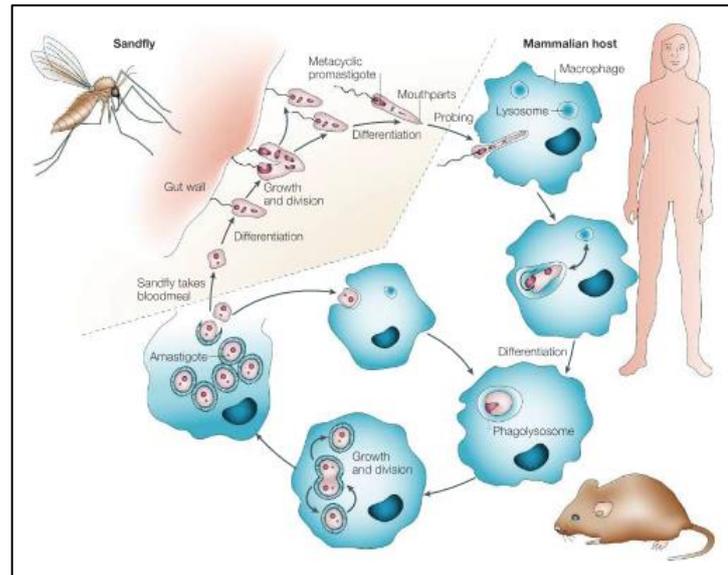
2.4 Ciclo biológico da *L. infantum*

Ao realizar o repasto sanguíneo em hospedeiros infectados, as fêmeas dos flebotomíneos ingerem o parasito em sua forma amastigota, presente em macrófagos. Os parasitos e o sangue ingeridos passam então pelo processo de digestão, no intestino médio dos flebotomos, dando início à etapa de metaciclogênese do parasito. O estímulo de diferenciação das formas amastigotas para promastigotas, mais resistentes às novas condições de temperatura, oxigênio, nutrientes e pH, possibilitam a sobrevivência do protozoário no intestino do vetor (Secundino *et al.*, 2005).

Durante a metaciclogênese, o protozoário passa por diferentes formas promastigotas: procíclica, nectomonas, leptomonas, haptomonas e metacíclica. As promastigotas metacíclicas possuem a capacidade de comprometer a estrutura da válvula estomodeal dos flebotomíneos, através da secreção de quitinases, fazendo com que não ocorra retenção de sangue durante o repasto sanguíneo e consequente regurgitação do protozoário no local de picada, sendo, por isto, consideradas as formas infectantes para vertebrados (Schlein *et al.* 1992).

No hospedeiro vertebrado, as promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células do SMF e, uma vez nos fagolisossomos dessas células, se diferenciam em amastigotas. Inicia-se então a multiplicação dessas formas por divisão binária, até o rompimento da célula parasitada e a liberação de amastigotas, que infectam novas células do hospedeiro e disseminam a doença para diversos órgãos. A presença dessas formas no tecido cutâneo de espécies reservatórias resulta na fonte de infecção para outros flebotomíneos (Figura 6) (Sack e Noben-Trauth, 2002).

Figura 6 - Demonstração esquemática do ciclo de vida de protozoários do gênero *Leishmania*.



FONTE: SACKS e NOBEN-TRAUTH, (2002)

Os flebotomíneos vetores são insetos dípteros da família *Psychodidae*, popularmente conhecidos como “mosquito-palha” e classificado, de acordo com sua distribuição geográfica e características morfológicas, em dois gêneros de importância médica: *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Ashford, 1991). Estes insetos possuem ampla distribuição mundial, mas são mais abundantes em regiões tropicais. Nas Américas, já foram descritas mais de 500 espécies e, cerca de 60 delas são incriminadas, suspeitas ou confirmadas como transmissoras de parasitos do gênero *Leishmania* (Desjeux, 2004; Galati *et al.*, 1997).

O ciclo de vida dos flebotomíneos inicia-se nos ovos, que eclodem de 7 a 17 dias após a postura, passando por quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto. O tempo de desenvolvimento completo depende da espécie e das condições ambientais (Ferro *et al.*, 1997; Killick-Kendrick *et al.*, 1977).

Estes pequenos insetos possuem hábitos crepusculares e se abrigam em locais úmidos e escuros, como fendas de árvores e tocas de animais. As larvas se alimentam de matéria orgânica e os adultos, de fontes naturais de açúcar. Para a maturação do folículo ovariano e conseqüente oviposição, as fêmeas necessitam se alimentar do sangue de animais (Killick-Kendrick, 1999).

Durante o repasto sanguíneo, os flebotomos fêmeas acabam por injetar sua saliva nos tecidos dos hospedeiros, que possuem ação anti-inflamatória,

anticoagulante e vasodilatadora, provocando alterações fisiológicas importantes e favorecendo a transmissão da *Leishmania*. Dessa forma, os vetores não atuam simplesmente como disseminadores de parasitos; recentes avanços nas pesquisas acerca do papel da saliva de flebótomos na transmissão das leishmanioses vêm mostrando a existência de uma relação coevolutiva entre esses vetores e o patógeno por eles transmitidos (Kamhawi, *et al.*, 2000).

A espécie *Lu. longipalpis* (Figura 7) é considerada a principal transmissora de *L. infantum* no Brasil. Mais recentemente, estudos incriminam a espécie *Lu. cruzi* como vetor no ciclo da *L. infantum*, no estado do Mato Grosso do Sul (Brasil, 2014; Santos, 2019; galati *et al.*, 1997).

Figura 7 – *Lu. longipalpis* fêmea realizando repasto sanguíneo.



FONTE: Disponível em <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/image.ppat.v05.i08>

A espécie *Migonemyia migonei* é constantemente encontrada com DNA de *L. infantum* em áreas endêmicas para LV no Brasil (Carvalho *et al.*, 2010). Outras espécies, como *Lu. forattinii*, também já foram encontradas naturalmente infectadas com a espécie *L. infantum* em áreas com registros de casos autóctones da doença e ausência de *Lu. longipalpis* e/ou *Lu. cruzi* (Pita-Pereira *et al.*, 2008; Savani *et al.*, 2005). A infecção natural por *Leishmania* spp., em diferentes espécies de flebotomíneos, ainda não implicadas na transmissão da doença, indica a necessidade de novas investigações sobre a competência vetorial dessas espécies (Santos, 2019).

2.5 Reservatórios da *L. infantum*

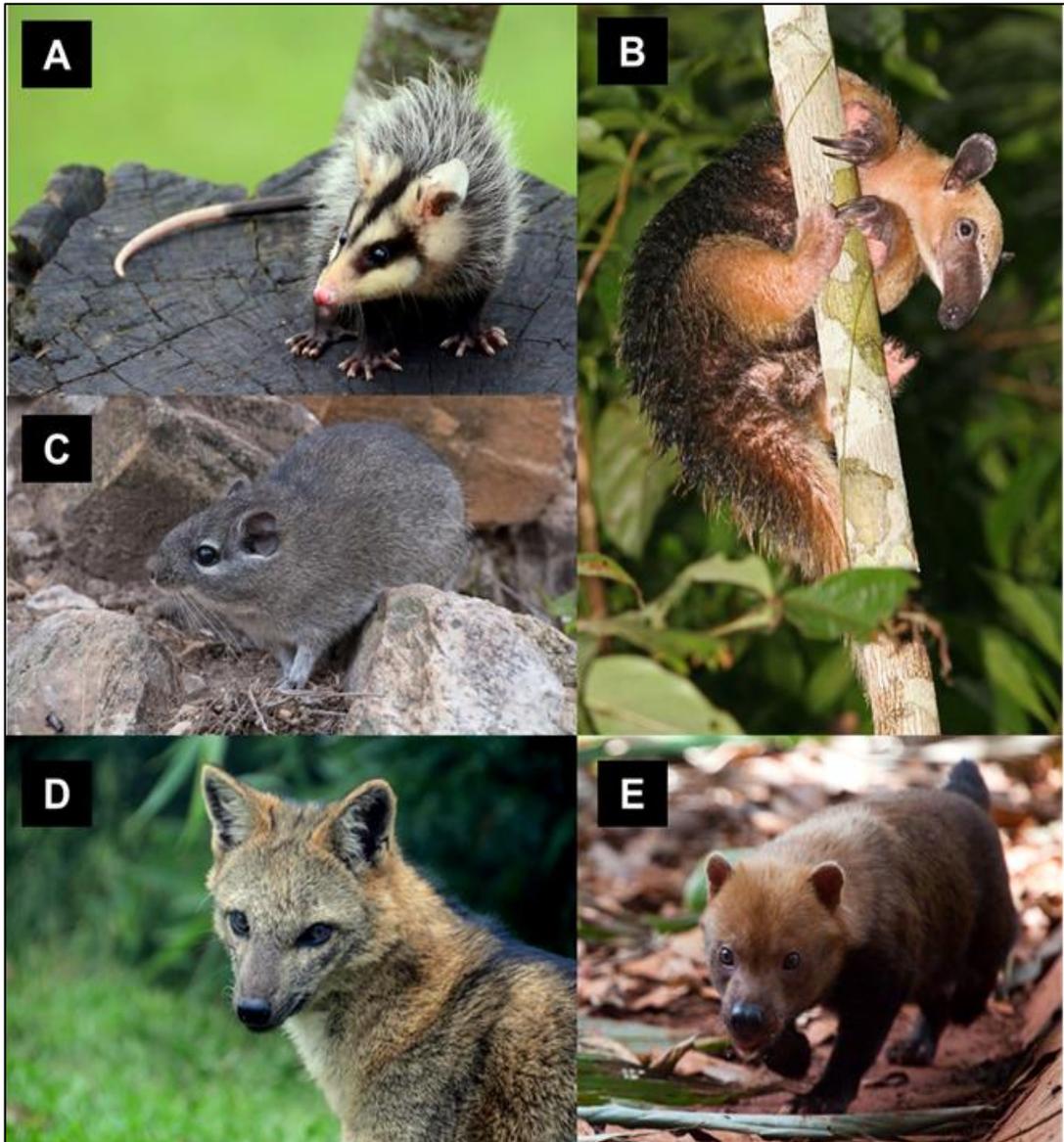
O papel epidemiológico das diversas espécies de animais encontradas infectadas por *L. infantum* é fonte de intensas discussões e pesquisas. A simples

identificação de DNA de *Leishmania* em uma espécie não a incrimina, necessariamente, como reservatório da doença, sendo necessária a avaliação de outras variáveis que indiquem sua competência na capacidade de transmissão e manutenção do parasito (Ashford, 1996).

Essas variáveis são determinadas por diferentes fatores relacionados aos hospedeiros, como espécie, estado de saúde, coinfeções e idade; ao parasito, como características moleculares e bioquímicas de cada espécie; e as diversas condições ambientais locais (Ashford, 1996; Rotureau, 2006). A atual gravidade sanitária que representa a LV enfatiza a necessidade de estudos profundos sobre sua cadeia epidemiológica, esclarecendo o real papel das espécies infectadas como reservatório de *L. infantum* (Roque, 2009; Rotureau, 2006; Shaw, 2007).

No ambiente silvestre, os estudos de dinâmica da infecção pelo parasito ainda são escassos (Travi *et al.*, 1998). A maioria dos trabalhos se restringe a apontar reservatórios, baseando-se apenas na prevalência de achados pontuais de infecção (Roque e Jansen, 2014). Desta forma, várias espécies de mamíferos já foram identificadas apresentando infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, como roedores, canídeos e felinos selvagens, primatas, morcegos e marsupiais (Silva *et al.*, 2001). Porém, até o momento, apenas algumas espécies são consideradas potenciais reservatórios para *L. infantum* no Brasil: *Didelphis albiventris* (gambá) (Figura 8A), *Tamandua tetradactyla* (Tamanduá-mirim) (Figura 8B), *Thrichomys apereoides* (Rato-boiadeiro) (Figura 8C), *Cerdocyon thous* (Graxaim-do-mato) (Figura 8D), e *Speothos venaticus* (Cachorro-vinagre) (Figura 8E) (Roque e Jansen, 2014).

Figura 8 - Potenciais reservatórios silvestres de *L. infantum* no território brasileiro.



FONTE: Disponível em www.ufrgs.br/faunadigitalrs

No ciclo epidemiológico urbano, o cão é considerado o principal reservatório de *L. infantum* (Dantas-Torres, 2009; Oliva *et al.*, 2006; Reguera *et al.*, 2016). A alta prevalência de infecção canina em áreas endêmicas, o intenso parasitismo cutâneo e sua estreita proximidade com humanos reforçam o papel da espécie como elo fundamental no ciclo de transmissão para humanos (Dantas-Torres, 2007; Gallego, 2004; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A LVC se apresenta com um amplo espectro clínico, sendo possível observar desde animais infectados sem alterações clínicas até manifestações clínicas severas da doença (Garcia-Castro *et al.* 2022).

A resposta imune do hospedeiro à infecção pelo protozoário desempenha papel crítico na disseminação do parasito e consequente evolução para doença, com suas diversas manifestações clínicas: emagrecimento, onicogrifose, dermatite descamativa e lesões ulcerativas em focinho e pontas de orelha (Garcia-Castro *et al.* 2022).

Outros fatores que estejam associados ao risco de infecção por *Leishmania* spp. em cães ainda não estão completamente elucidados. Porém, aspectos socioeconômicos e ambientais, como a presença de árvores frutíferas no ambiente, animais que vivem em áreas externas, existência de casas com quintal contíguo à habitação e falta de limpeza do canil parecem ter um importante papel na epidemiologia da doença (Carvalho *et al.*, 2018).

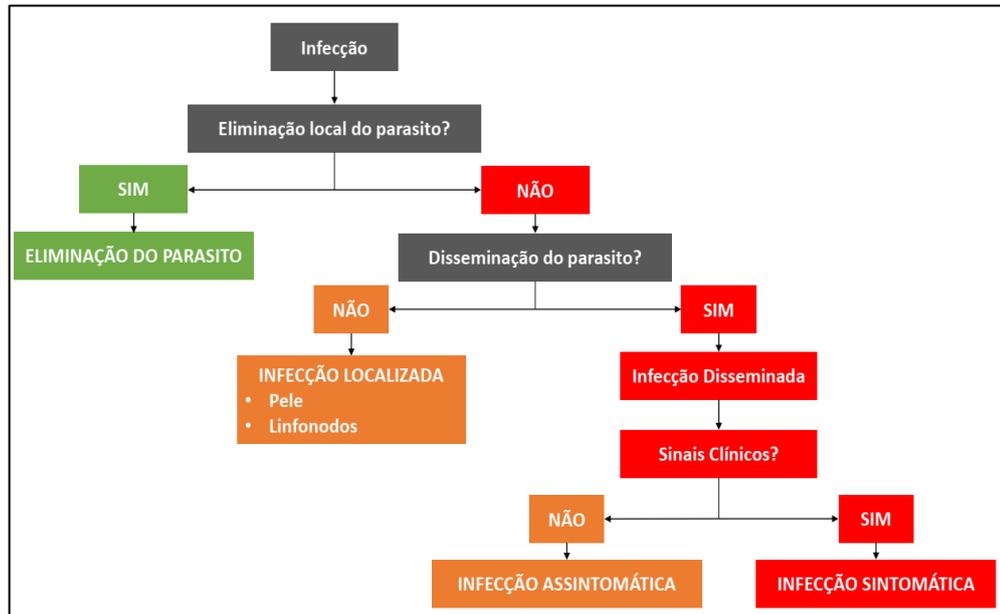
A seleção natural atua favorecendo genótipos resistentes para a doença, como a raça canina Ibizan Hound que, apesar de viver em área endêmica para a doença em regiões da Espanha e com exposição ao protozoário semelhante a outras raças, apresenta frequência mais baixa da doença. Por outro lado, algumas raças demonstram clara susceptibilidade à LVC, como Boxer, Pastor Alemão e Rottweiler (Miranda *et al.*, 2008; Saridomichelakis, 2009).

2.6 LVC

A LVC pode levar ao aparecimento de uma ampla gama de sinais clínicos, como dermatites descamativa e/ou papular, alopecias, úlceras de difícil cicatrização em pontas de orelhas, onicogrifose, blefarite, apatia, uveíte e úlceras de córnea, lesão em plano nasal, alterações renais, atrofia muscular, claudicação, emagrecimento e diarreia (Baneth e Aroch, 2008; Gonçalves *et al.*, 2019).

O perfil de resistência ou suscetibilidade canina é influenciado por diversos fatores, dentre eles o *background* genético do indivíduo. Após a infecção por *L. infantum*, o tipo de resposta imune montada frente ao parasito pode determinar diversos resultados no organismo: eliminação do parasito, infecção localizada, disseminação com doença subclínica ou clínica (Figura 9) (Soutter, *et al.*, 2019).

Figura 9 - Possibilidades de resultados da infecção por *L. infantum* na espécie canina.



FONTE: SARIDOMICHELAKIS (2009)

É bem estabelecido que, na LVC, indivíduos com prevalência de resposta do tipo celular Th1, com estímulo de linfócitos T CD4+, produção de INF- γ e ativação de morte intracelular de amastigotas por macrófagos, geralmente, possuem resistência à infecção. Por outro lado, o desvio para resposta imune tipo Th2 leva à produção de altos títulos de anticorpos não protetores e formação de imunocomplexos, resultando no aparecimento de sinais clínicos da doença (Gonçalves *et al.*, 2019; Pinelli *et al.*, 1994).

No Brasil, a eutanásia de cães sororreagentes é uma das medidas de controle para LV adotada pelas autoridades de saúde. Essa recomendação se baseia no fato de a espécie ser o principal reservatório de *L. infantum* no meio urbano, com casos caninos muitas vezes precedendo a doença em humanos e grande responsável pelo avanço espacial e temporal dos casos humanos. (Alves e Bevilacqua, 2004; Oliveira *et al.*, 2001; Romero e Boelaert, 2010).

Estima-se que a porcentagem de cães infectados em áreas endêmicas pode chegar a 67%, sendo a forma subclínica da doença a mais comum (Coutinho *et al.*, 1985). Essa realidade constitui importante empecilho no controle efetivo da LV, uma vez que a produção de anticorpos é limitada nessa forma de doença, dificultando o diagnóstico sorológico canino e permitindo a permanência de animais como fonte

inquantificável de infecção para flebotomíneos vetores (Baneth e Aroch, 2008; Courteney *et al.*, 2014; Garcia-Castro *et al.*, 2022).

Em 2016, o tratamento da LVC foi legalmente autorizado no Brasil, a partir da Nota Técnica Conjunta nº 001/2016, que permitiu o registro final de um produto exclusivamente veterinário, contendo como princípio ativo a miltefosina para tratamento de LVC (BRASIL, 2016).

Desde a liberação do tratamento da LVC, muitos avanços têm sido alcançados nas áreas de terapêutica e prognóstico da doença. Em 2018, o grupo Brasileish, organização não governamental, formada por médicos veterinários, elaborou um documento com diretrizes para diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da doença no país, com objetivo de propor um estadiamento clínico e tratamento da doença baseado em evidências científicas e adaptado à realidade da América do Sul (Brasileish, 2018).

O grupo orientou que o tratamento da LVC deve ser realizado com protocolos que produzam melhora clínica e redução da carga parasitária. Além disso, todos os animais em tratamento devem utilizar inseticidas tópicos com propriedade repelente, a fim de minimizar o risco de transmissão (Brasileish, 2018; Ribeiro *et al.*, 2013).

2.7 Diagnóstico da LVC

Idealmente, espera-se que os testes diagnósticos para LVC sejam capazes de detectar a infecção em quadros com sinais clínicos presentes ou ausentes; tenham realização simples; custo reduzido, aplicabilidade à campo; e, preferencialmente, utilizem amostras obtidas através de técnicas pouco invasivas (Maia e Campino, 2008).

Além disso, alta sensibilidade e especificidade são esperadas, a fim de se evitar resultados falso-negativos, que subestimam as taxas de infecção em populações caninas e falso-positivos, que possam levar à eutanásia desnecessária de cães (Ferreira *et al.*, 2007).

Atualmente, para diagnóstico da LVC, os órgãos públicos brasileiros utilizam o TR-DPP® como teste de triagem, e o kit ELISA EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos® (EIE-LVC), como confirmação para indicação de eutanásia de animais sororreagentes (Rocha *et al.*, 2020). Essa escolha se baseia na evidência de

que cães doentes apresentam altos títulos de anticorpos, devido à prevalência da resposta humoral tipo Th2 (Ashford *et al.*, 1996; Marzochi *et al.*, 1985; Reithinger *et al.*, 2002).

Porém, a prevalência de cães infectados sem sinais clínicos é consideravelmente maior do que a doença clínica aparente, sendo necessário o aprimoramento das metodologias diagnósticas para auxiliar na implementação de medidas de prevenção e controle mais eficazes para a LV (Baneth e Aroch, 2008; Courtenay *et al.*, 2014; Maia e Campino, 2008).

2.7.1 Diagnóstico Sorológico

Os testes sorológicos são amplamente utilizados para diagnóstico de LVC, baseando-se na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em soro de cães infectados. Porém, embora a resposta humoral seja normalmente muito intensa na doença, essas técnicas apresentam limitações em animais sem sinais clínicos, podendo subestimar as taxas de infecção canina em inquéritos sorológicos de áreas endêmicas e permitirem a permanência de fontes de infecção para vetores (Alves *et al.*, 2004; Paz *et al.*, 2018; Travi *et al.*, 2018).

A sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos apresentam grandes variações devido à falta de padronização, ao uso de diferentes antígenos, à seleção de diferentes diluições de corte, à persistência de anticorpos após recuperação da infecção canina e às reações cruzadas observadas com outros patógenos, como *T. cruzi* e outras espécies de *Leishmania* (alvar *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2008; PAZ *et al.*, 2018).

Outro limitante para o uso destas metodologias é o fato de que a detecção sérica de anticorpos anti-*Leishmania* é um indicativo de exposição ao protozoário, e não necessariamente de infecção. Além disso, é possível detectar níveis baixos de anticorpos transitórios em cães expostos ao parasito, mas que não desenvolveram doença clínica (Baneth e Aroch, 2008).

Diversos métodos sorológicos foram desenvolvidos e são amplamente utilizados na detecção de anticorpos específicos contra *L. infantum*, como o método de aglutinação direta (DAT), imunofluorescência indireta de anticorpos (IFAT), ELISA e imunocromatografia. Esses testes apresentam como vantagens o baixo custo,

realização simples, aplicabilidade à campo e utilização de amostras não invasivas (Travi *et al.*, 2018).

2.7.1.1 TR-DPP®

O kit TR-DPP® (Figura 10) é um teste imunocromatográfico qualitativo para detecção rápida de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza a proteína de fusão rK26/rK39. Amostras de soro, plasma ou sangue total venoso canino podem ser utilizados com resultado em 15 minutos. O kit é atualmente produzido pela Bio-Manguinhos - Rio de Janeiro, Brasil (Grimaldi *et al.*, 2012; Mettler *et al.*, 2005).

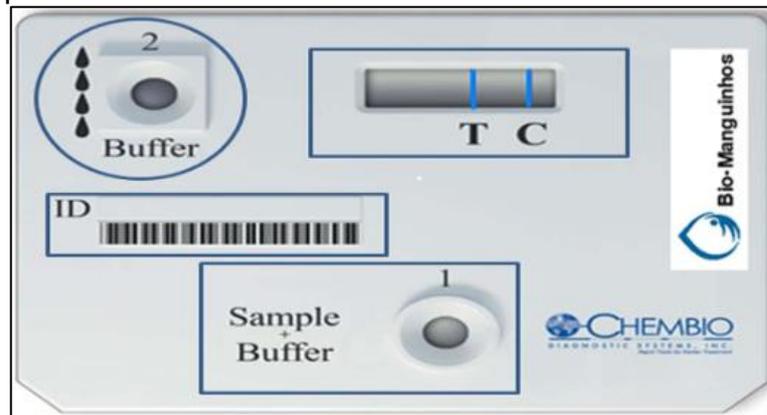
Figura 10 - Kit TR-DPP®.



FONTE: Disponível em www.bio.fiocruz.br/index.php/br/produtos/reativos/testes-rapidos/dppr-leishmaniose-canina

O kit contém um dispositivo descartável (Figura 15), que consiste em um cassete de plástico contendo duas tiras de nitrocelulose, conectadas em forma de 'T', permitindo a aplicação da amostra teste e do reagente de detecção de anticorpos de forma separada (Grimaldi *et al.*, 2012).

Figura 11 - Dispositivo TR-DPP®.



FONTE: QUEIROZ (2011)

A amostra a ser analisada é adicionada no espaço designado e migra para a tira contendo uma linha de teste (T) com presença do antígeno K26/K39 e para a linha de controle (C). A adição de quatro gotas de tampão ao poço do conjugado libera partículas secas de ouro coloidal acopladas à proteína A/G, facilitando sua migração ao longo da segunda tira para a área de teste. As partículas de ouro então reagem aos anticorpos ligados ao antígeno que estão presentes, criando um complexo imunológico colorido para visualização da banda de teste, enquanto na ausência de anticorpos específicos, nenhuma banda é visível na janela de teste (Grimaldi *et al.*, 2012; Qr, 2011).

Como as partículas de ouro continuam migrando ao longo da segunda faixa, uma faixa marrom semelhante é produzida na área de controle do dispositivo, independentemente da presença de anticorpo na amostra de teste, possibilitando a visualização da linha na área do controle positivo e a verificação do funcionamento dos reagentes do kit (Gr *et al.*, 2012; Queiroz, 2011).

Segundo o fabricante, o TR-DPP® apresenta sensibilidade de 92,9 a 100% e especificidade de 87,5 a 91,7%, com importante aplicabilidade à campo para diagnosticar cães com doença ativa. A metodologia, porém, falha na identificação da doença subclínica e a ocorrência de reações cruzadas já foi relatada em soro derivado de cães, como em infecção dérmica ativa por *L. braziliensis* e sem histórico de exposição potencial a *L. infantum* (Gr *et al.*, 2012; Qr, 2011).

2.7.1.2 ELISA

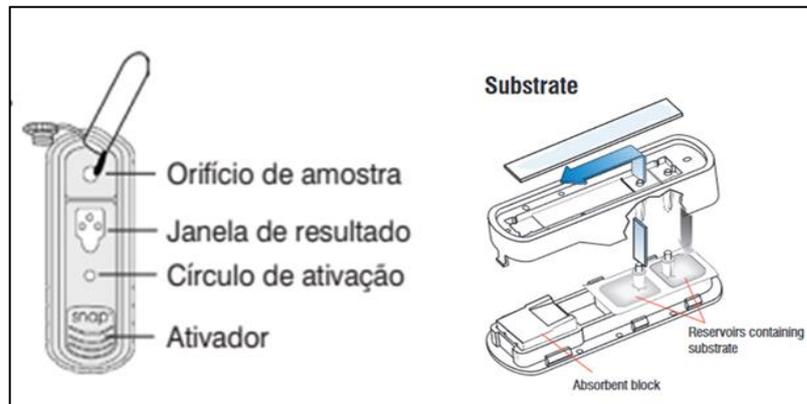
O método imunoenzimático ELISA pode ser realizado com vários tipos de antígenos e as taxas de sensibilidade variam entre 90 e 100%. Os valores de especificidade, no entanto, são bastante inconsistentes, variando de 71 a 100% (Pedras *et al.*, 2008). Resultados falso-positivos têm sido relatados em animais infectados com *T. caninum*, *T. cruzi*, e outras espécies de *Leishmania* (Alves *et al.*, 2012; Marcondes *et al.*, 2011).

A baixa especificidade é a desvantagem comum aos métodos que utilizam antígenos não purificados, podendo ser causada por reatividade cruzada com outros patógenos e pela persistência de anticorpos após a cura. O uso de antígenos purificados sintéticos ou recombinantes, como a rK39, é uma alternativa para controlar esse problema (Burns *et al.*, 1993).

Ensaio comerciais de detecção rápida para diagnóstico de LVC têm sido comumente utilizados, porém demonstraram menor sensibilidade e especificidade, quando comparados aos métodos sorológicos convencionais. Embora com desempenho inferior, o uso desses testes é comum na rotina de clínicas veterinárias particulares, por sua facilidade de uso e rapidez na entrega de resultados (Marcondes *et al.*, 2011; Reithinger *et al.*, 2002).

Dentre os testes rápidos ELISA, o SNAP® *Leishmania*, da fabricante IDEXX (ELISA IDEXX) (Figura 12) é disponibilizado como um kit para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* com sensibilidade de 96,3% e especificidade de 99,2%. Segundo o fabricante, o produto é um ensaio imunoenzimático que utiliza promastigotas de *L. infantum* como antígenos para detecção de anticorpos contra *L. donovani* ou *L. infantum* em soro, plasma, ou sangue total caninos e tempo para resultado de seis minutos (IDEXX).

Figura 12 - SNAP® *Leishmania* – ELISA IDEXX.



FONTE: Bula do kit IDEXX.

Em comparação aos testes rápidos que utilizam o fluxo lateral, o ELISA IDEXX utiliza a tecnologia de fluxo bidirecional para melhorar a acurácia da metodologia. A amostra é inicialmente misturada ao conjugado fornecido e a solução adicionada no orifício de amostra do dispositivo, que flui pela parte superior do analisador para que ocorra a ligação com os antígenos até atingir o círculo de ativação.

Após a coloração desse círculo, realiza-se pressão no ativador para que ele esteja rente ao corpo do dispositivo (Figura 13), permitindo um segundo fluxo pelo dispositivo e novas ligações.

Figura 13 - Acionamento do dispositivo SNAP® *Leishmania* - ELISA IDEXX.



FONTE: Bula do kit IDEXX.

Em seguida, ocorre um procedimento de lavagem para remoção de componentes não ligados da amostra, que possam interferir na reação, melhorando a visualização do resultado na janela de resultados. Por fim, ocorre uma etapa de

amplificação ELISA de antígenos ligados e é possível observar o resultado na janela de resultados (IDEXX).

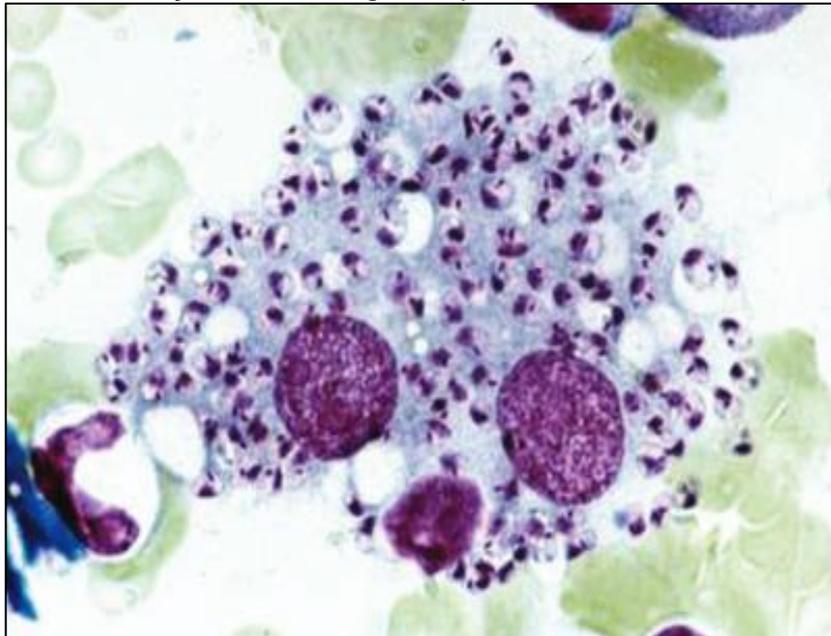
Em um estudo conduzido por Ribeiro *et al.* (2019), comparando a performance de diferentes testes rápidos utilizados no diagnóstico de LVC no Brasil, o ELISA IDEXX apresentou 100% de especificidade e 96,3% de sensibilidade. Comparando as taxas de sensibilidade encontradas pelos autores, não foi observada diferença estatística entre o ELISA IDEXX e EIE-LVC (95,5%).

2.7.1.3 Diagnóstico Parasitológico

O diagnóstico de LVC é confirmado pela presença do parasito no cão infectado, sendo os métodos parasitológicos considerados padrão ouro para a detecção de infecção (Gomes *et al.*, 2008).

A citologia direta por microscopia óptica permite a observação de amastigotas (Figura 14) em esfregaços corados de medula óssea, pele ou aspirados de linfonodos e baço (Corrêa e Corrêa, 1992; Gomes *et al.*, 2008).

Figura 14 - Formas amastigotas de *Leishmania* sp. visualizadas por microscopia em objetiva 100x com coloração hematológica rápida.



FONTE: Imani *et al.* (2014)

Relatos descrevendo a presença de amastigotas em massas nodulares de localização atípica, como língua, testículos e massas orais ou nasais, também já foram

relatados após aspiração com agulha fina (Gomes *et al.*, 2008; Paltrinieri *et al.*, 2016). Porém, a avaliação das lâminas apresenta sensibilidade variável, a depender de diversos fatores, como a experiência do profissional, tempo de leitura e das variações normais de carga parasitária tecidual durante o curso da infecção (Akhoundi *et al.*, 2017; Gomes *et al.*, 2008).

A histopatologia, com cortes corados com hematoxilina-eosina possui custo maior que a citologia e requer experiência e treinamento consideráveis. Além disso, pode produzir resultados falso positivos porque os artefatos podem ser erroneamente considerados amastigotas (Maia e Campino, 2008; Morales-Yuste *et al.*, 2022). Comparada com a citologia, a histologia é mais trabalhosa e demorada, e a identificação de amastigotas pode ser mais difícil. Por outro lado, a histologia tem a vantagem de fornecer informações adicionais sobre o padrão citoarquitetônico das lesões, permitindo a discriminação entre cães em que o parasito está associado a lesões típicas e aqueles em que a infecção não parece estar associada à doença (Paltrinieri *et al.*, 2016; Morales-Yuste *et al.*, 2022).

Abordagens imunohistoquímicas (IHC) em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina podem ser usados como uma ferramenta complementar na confirmação diagnóstica da LVC (Hofman *et al.*, 2003). A IHC utiliza o princípio antígeno-anticorpo para determinar a expressão de biomarcadores específicos em diferentes tipos de células e tecidos, melhorando substancialmente o diagnóstico baseado na histopatologia devido à maior sensibilidade e especificidade (Queiroz *et al.*, 2010).

A cultura *in vitro* e o isolamento em animais de laboratório a partir de aspirados, raspados ou biópsias de tecidos permite a visualização de formas promastigotas de *Leishmania* e pode ser considerada uma importante técnica para diagnóstico, porém, são métodos demorados, caros e a recuperação de parasitos raramente é maior que 70%, mesmo para cepas que são facilmente mantidas *in vitro* (Corrêa e Corrêa, 1992).

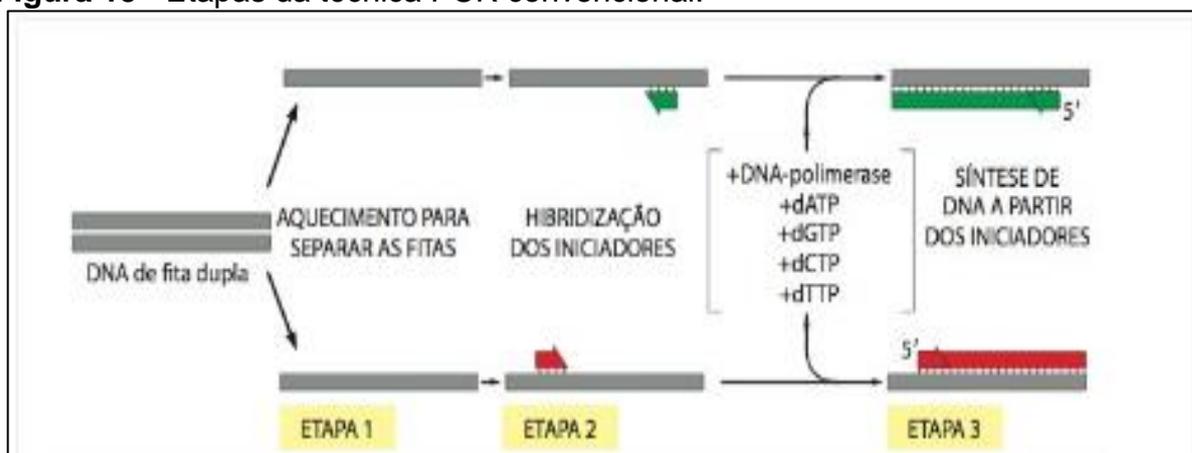
O xenodiagnóstico é um método relativamente simples, com sensibilidade e especificidade razoáveis, porém, falha em discriminar as espécies de *Leishmania*, é demorado, semiquantitativo e não viável sem instalações para animais/insetários (Akhoundi *et al.* 2017).

2.7.1.4 Molecular

A técnica de PCR foi descrita inicialmente em 1986 por Mullis, como um método de amplificação de ácidos nucléicos, realizado por meio da ação de uma enzima polimerase em diferentes temperaturas. Atualmente, a PCR é amplamente utilizada como ferramenta molecular diagnóstica em diversas infecções, principalmente por sua alta sensibilidade e especificidade (Mullis *et al.*, 1986; Talmi-Frank *et al.* 2010). Ao longo dos anos, inovações tecnológicas e variações da PCR convencional foram surgindo, como a PCR em tempo real, permitindo expansão do uso da técnica e melhorias na sua versatilidade (Wong *et al.*, 2018).

Para a realização da PCR convencional, é realizada uma etapa prévia de extração e purificação do DNA proveniente da amostra suspeita. O material genético obtido é então submetido a repetição de ciclos, no termociclador, compostos por três etapas (Figura 15): (i) desnaturação, quando ocorre a separação da fita dupla de DNA a $\pm 95^{\circ}\text{C}$; (ii) anelamento, com ligação dos *primers* às sequências complementares da região alvo a $\pm 60^{\circ}\text{C}$, servindo como iniciadores da enzima polimerase; e (iii) extensão a $\pm 72^{\circ}\text{C}$, quando a polimerase liga-se a fita sinalizada pelos *primers*, iniciando a sequência que será replicada para formação da fita dupla de DNA (Duarte *et al.*, 2011).

Figura 15 - Etapas da técnica PCR convencional.

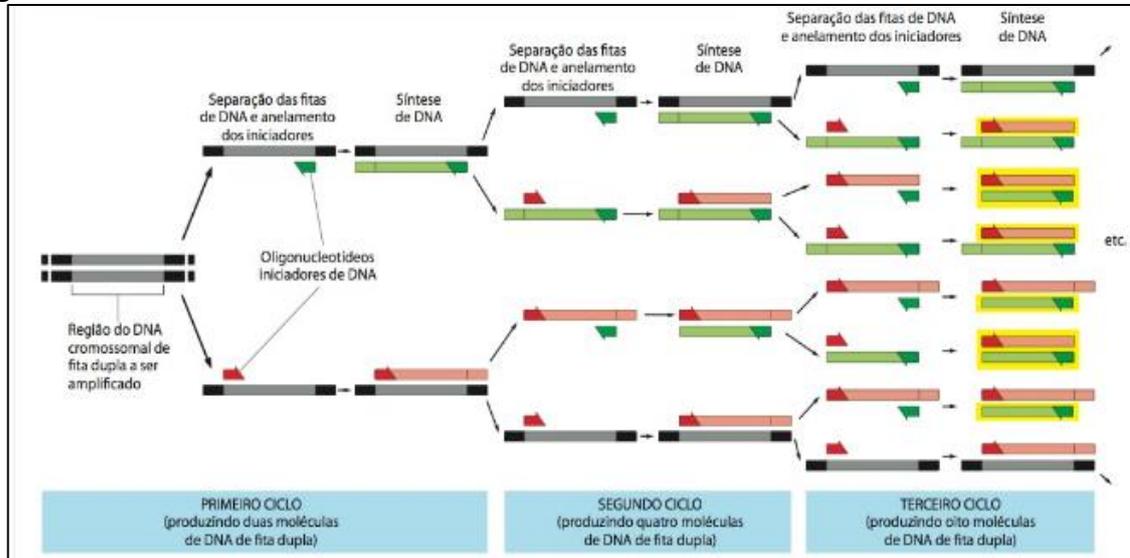


FONTE: BRUCES *et al.* (2011)

Termocicladores repetem as etapas de cada ciclo por 30 a 35 vezes (Figura 16) e, ao final da reação, é necessária uma última etapa para separação e detecção dos fragmentos de DNA amplificados: a eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. Todo esse processo tem alto custo, é laborioso, demanda tempo e

necessita de equipamentos específicos e profissionais treinados, tornando a PCR convencional muitas vezes inacessível (Duarte *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2010).

Figura 16 - Ciclos da técnica PCR convencional.



FONTE: BRUCES *et al.* (2011)

Uma etapa adicional à PCR convencional é o polimorfismo de comprimento de fragmento de DNA (RFLP). Essa técnica é utilizada para produzir marcadores moleculares por meio da amplificação seletiva de fragmentos de restrição de diferentes comprimentos, obtidos a partir da digestão das enzimas de restrição do DNA (Akhoundi *et al.*, 2017). A variação de comprimento e a diferença nos números e padrões dos fragmentos obtidos em produtos da PCR convencional podem ser utilizados na diferenciação de espécies de *Leishmania* (Fraga *et al.*, 2010).

Dos métodos moleculares, a PCR-RFLP e a análise de sequência acoplada ao alvo apropriado no genoma são os mais adequados para a discriminação de todas as espécies de *Leishmania* e, em muitos casos, a combinação de diferentes marcadores deve ser aplicada para determinar a espécie estudada (Fraga *et al.*, 2010; Harris *et al.*, 1998).

Uma variação da técnica de PCR convencional é a PCR em tempo real ou quantitativa (qPCR). Esse método é vinculado a um sistema de monitoramento que detecta e quantifica a emissão de fluorescência durante os ciclos de amplificação da reação, trazendo agilidade na obtenção de resultados e minimizando os riscos de possíveis contaminações (Sevilha-Santos *et al.*, 2019). Comparada à modalidade convencional, a qPCR possui maior reprodutibilidade, especificidade, sensibilidade,

precisão e acurácia diagnóstica, possibilitando a quantificação dos resultados obtidos, a avaliação de resposta a tratamentos ou progressão da doença e a detecção de múltiplos alvos em uma mesma amostra (qPCR Multiplex) (Jara *et al.*, 2013; Meide *et al.*, 2005).

Diversos alvos para PCR já foram publicados com base em regiões codificantes e/ou não codificantes no genoma das *Leishmania*, que, assim como outros tripanossomatídeos, têm características únicas de organização genômica comparados com eucariontes, como pequenos cromossomos com alta densidade gênica (Rosales-Chilama *et al.*, 2015). Esses flagelados possuem ainda uma região conhecida como cinetoplasto, localizado na mitocôndria, que contém uma grande rede de DNA conhecida como DNA do cinetoplasto (kDNA). Tradicionalmente o kDNA é o alvo para PCR utilizado com mais frequência para detecção e tipagem de *Leishmania*, devido à sua natureza multicópia e alta sensibilidade (Degraeve *et al.*, 1994; Lukeš *et al.*, 2002; Simpson, 1987).

Outro alvo utilizado na técnica é o espaçador transcrito interno (ITS-1), que se refere ao DNA espaçador não codificante, variando de 50 a 350 pb e com conservação suficientemente alta para ser utilizado como alvo na PCR para *Leishmania*, particularmente na diferenciação de espécies do subgênero *Leishmania* (Akhoundi *et al.*, 2017; Lukeš *et al.*, 2002; Nasereddin *et al.*, 2006).

As proteínas de choque térmico (HSPs) são altamente conservadas e mantêm homeostase proteica em situações de estresse do parasito, interagindo com proteínas desnaturadas e inibindo a formação de agregados proteicos citotóxicos. A maioria das HSPs possuem múltiplos alvos de interação para controlar sua maturação, ativação, translocação e degradação, e, com base em suas massas moleculares e estruturas primárias, foram divididas em famílias, dentre elas a HSP70. O gene codificador destas proteínas (*hsp70*) é utilizado como alvo da PCR, particularmente na diferenciação de espécies do subgênero *Viannia* (Fraga *et al.*, 2010).

O potencial antigênico da hydrophilic acylated surface protein B (HASP B) vem sendo constantemente estudado como alvo para PCR no diagnóstico da LV (Mohapatra *et al.*, 2010; Sádlová *et al.*, 2010). A proteína HASP B, também conhecida como K26, é uma proteína codificada por um grupo de genes ortólogos conhecidos como *LmcDNA16* e localizados no cromossomo 23, fazendo parte de uma família heterogênea de moléculas de superfície das espécies do gênero *Leishmania* (Flinn e

Smith, 1992; Sádlová *et al.*, 2010). A molécula tem demonstrado aplicabilidade para o sorodiagnóstico, definindo infecções promovidas pelo complexo *L. donovani* (Mohapatra *et al.*, 2010) e está presente nas formas promastigota e amastigota do parasito, favorecendo a metaciclogênese e a localização da forma promastigota no intestino médio do vetor flebotomíneo (Sádlová *et al.*, 2010).

Apesar dos métodos baseados em PCR terem se mostrado muito eficazes no diagnóstico das leishmanioses, com alta sensibilidade e especificidade, alguns fatores limitam seu uso como diagnóstico *point of care*: (i) não existência de um método padronizado; (ii) diversidade de alvos utilizados; (iii) equipamentos e reagentes caros; (iv) tempo de reação (Harris *et al.*, 1998; Marcelino *et al.*, 2020; OMS, 2010; Wong *et al.*, 2018).

2.8 LAMP

2.8.1 Aspectos gerais

Dentre as técnicas isotérmicas para amplificação de DNA, a LAMP se tornou a mais popular devido à maior facilidade, rapidez e simplicidade na execução; utilizando apenas uma enzima na reação e ocorrendo em condições isotérmicas (Avelar *et al.*, 2019; Mendes, 2020; Notomi *et al.*, 2000).

A alta especificidade conferida pelos *primers* internos utilizados, o tempo reduzido de aproximadamente 35 minutos para a reação, a alta sensibilidade e a possibilidade de realização em laboratórios de biologia molecular que não possuam equipamentos complexos são características que trazem grande visibilidade para esta metodologia (Avelar *et al.*, 2019; Notomi *et al.*, 2000).

A LAMP promove uma repetição alternadamente invertida da sequência alvo, que se dá em duas etapas: cíclica e não cíclica. Ao final da reação são produzidos fragmentos amplificados de DNA de diferentes tamanhos, que, observados no gel de agarose apresentam um padrão diferente da PCR (Mendes, 2020; Notomi *et al.*, 2000).

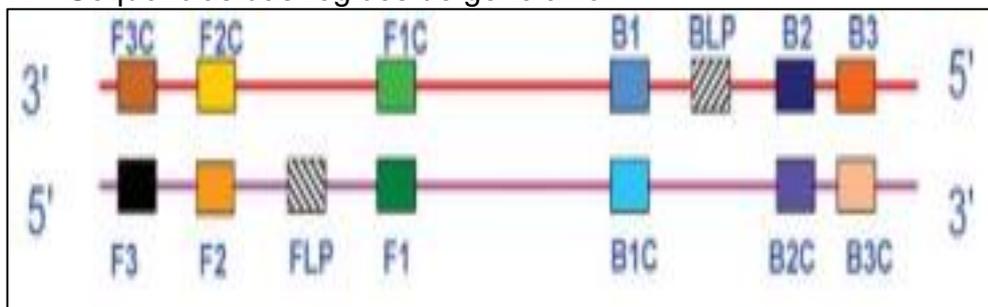
Além disso, a LAMP não é fortemente afetada por inibidores, podendo ser realizada diretamente em uma variedade de amostras como soro, sangue, urina e sêmen. Assim, a reação pode ser aplicada em situações e locais de recursos

escassos, já que não requer equipamentos sofisticados e nem uma etapa prévia de preparo da amostra (Herrada *et al.*, 2018; Mendes, 2020; Notomi *et al.*, 2000). Os produtos amplificados na LAMP podem ser detectados visualmente utilizando-se diferentes estratégias como turbidez, fluxo lateral ou fluorescência, gerada pela adição de um intercalante de DNA na reação (Mendes, 2020; Notomi *et al.*, 2000; Tomita *et al.*, 2008).

2.8.2 Metodologia LAMP

A amplificação do ácido nucleico na LAMP ocorre através do deslocamento da fita de DNA, por meio da enzima *Bst* DNA polimerase, oriunda do DNA do *Bacillus stearothermophilus* com atividade 5' → 3'; e de, no mínimo, dois pares de iniciadores (FIP-*forward inner primer* e BIP- *backward inner primer*, F3 e B3 *outer primers*). Primers do tipo *loop* (LBP e LFP *loop primers*) podem ser utilizados para acelerar a reação. Esses iniciadores são desenhados previamente para reconhecer seis a oito regiões distintas de um gene alvo (Figura 17) (Mendes, 2020; Notomi *et al.*, 2000).

Figura 17 - Sequências das regiões de gene alvo.



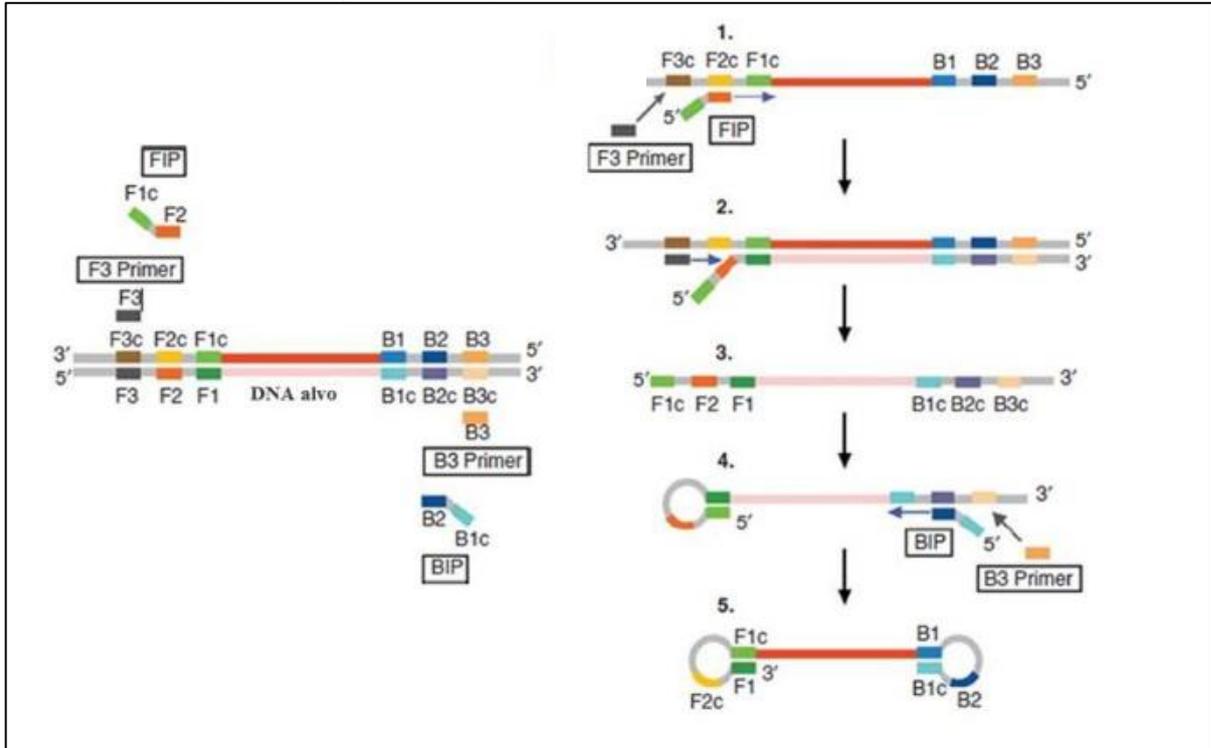
FONTE: PARIDA *et al.* (2008)

A reação ocorre em duas etapas: a primeira não cíclica, formando *loops* nas extremidades da fita de DNA, que servirão como ponto de partida para que ocorra a segunda etapa, cíclica, com a reação de amplificação (Mendes, 2020; Notomi *et al.*, 2000).

A etapa não cíclica (Figura 18) tem início quando o iniciador FIP hibridiza na região F2c da sequência alvo e direciona a enzima para síntese de uma fita complementar. Em seguida, o iniciador F3 reconhece a sua região alvo F3c e, ao se hibridizar a ela, direciona a enzima para iniciar a extensão da fita. Enquanto a fita complementar de DNA é sintetizada, ela é deslocada e nessa fita o iniciador BIP irá

reconhecer sua região específica, B2c, e se hibridizará a ela. Em seguida, B3 irá reconhecer a sua região alvo, B3c, e provocará o deslocamento da fita sintetizada (Mendes, 2020; Notomi *et al.*, 2000; Tomita *et al.*, 2008).

Figura 18 - Representação da etapa não cíclica da LAMP.



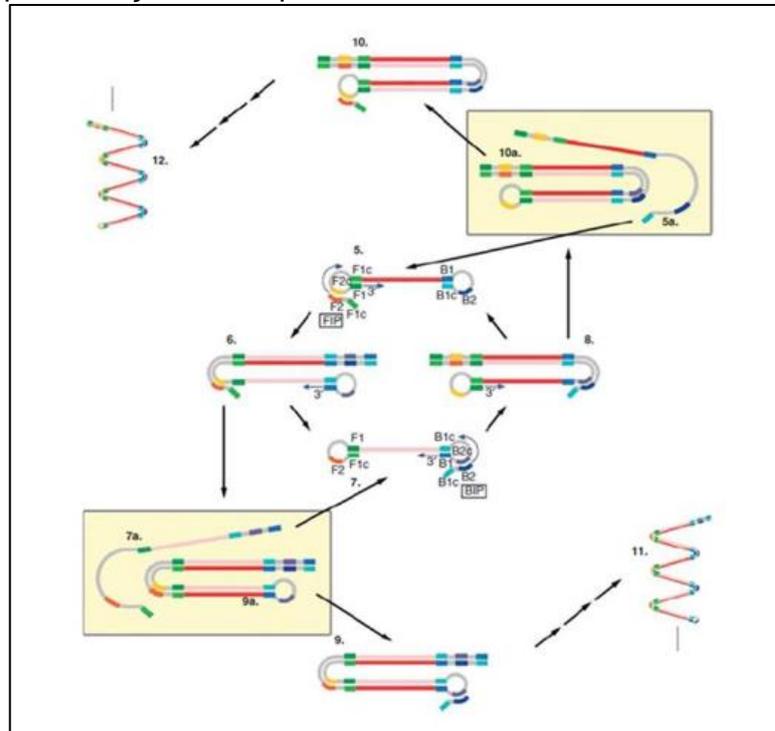
FONTE: MENDES (2020)

Ao final, a fita sintetizada apresentará dois *loops*, um em cada extremidade, como resultado da proximidade das regiões complementares presentes nos iniciadores FIP e BIP (Mendes, 2020; Notomi *et al.*, 2000).

Na última etapa da reação, atuarão apenas os iniciadores internos, quando FIP reconhece a região F2c presente na extremidade 3' e direciona a enzima para a síntese da fita complementar. Ao final da síntese, é formado um intermediário chamado haste-laço que promove a autoativação da síntese, como é mostrado na Figura 19. Após a hibridização e formação do *loop* pelas regiões B1 e B1c, a síntese é iniciada. Ao formar o intermediário haste-laço, a fita anteriormente sintetizada pelo iniciador FIP é liberada. A fita simples liberada é uma repetição invertida da estrutura de partida, e é nessa fita invertida que o iniciador BIP reconhece a região B2c, esse se hibridiza e sintetiza o DNA, formando uma nova fita complementar que apresentará outras hastes-laços que são cópias alternadas da sequência alvo, esses poderão formar múltiplas estruturas devido ao deslocamento das fitas complementares sintetizadas pelos iniciadores internos. Esses ciclos são repetidos até que os

iniciadores internos sejam totalmente consumidos (Mendes, 2020; Notomi *et al.*, 2000).

Figura 19 - Representação da etapa cíclica da LAMP.

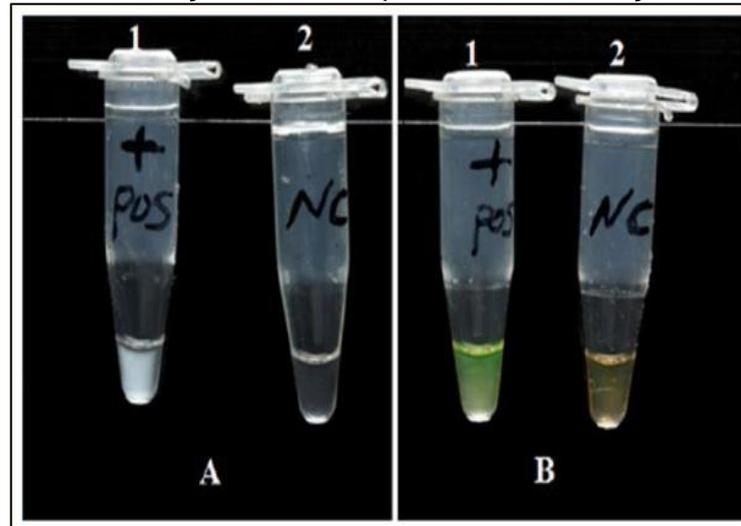


FONTE: MENDES (2020)

A reação de amplificação de DNA pela LAMP pode ter um tempo de duração de 15 a 60 minutos (PARIDA *et al.*, 2008). Após a amplificação, o resultado pode ser observado no próprio tubo, dispensando o uso da eletroforese em gel de agarose, etapa necessária para visualizar os produtos da PCR convencional (Khan *et al.*, 2011).

Os produtos do LAMP podem ser detectados visualmente pela turvação, fluorescência ou alteração de cor dos produtos (Figura 20), sendo ideal para monitoramento a olho nu ou análise por espectrofotômetro (Sriworarat *et al.*, 2015). A turbidez vista ao fim da reação de LAMP ocorre devido à formação de um precipitado branco decorrente da acumulação de pirofosfato de magnésio, em uma concentração diretamente proporcional à quantidade de produtos amplificados (Parida *et al.*, 2008).

Figura 20 - Método de detecção visual do ponto final da reação LAMP.



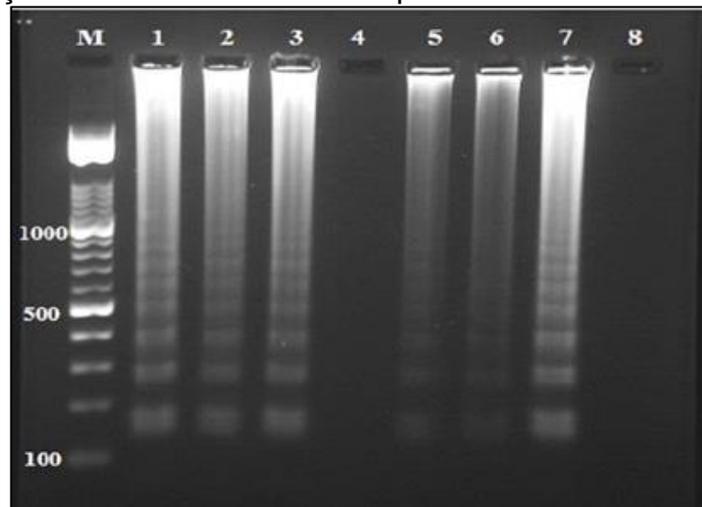
FONTE:GHASEMIAN *et al.* (2014)

(A) Avaliação da reação LAMP por turbidez. 1A, com DNA molde (positivo); 2A, sem DNA molde (negativo). (B) Detecção da reação LAMP por fluorescência, usando SYBR Green I. 1B, positivo - a cor da mistura da reação muda de laranja original para verde brilhante); 2B, negativo - a cor da mistura da reação permanece inalterada.

Outra forma de avaliação dos produtos da LAMP é a utilização de kits comerciais contendo corante colorimétrico, como o vermelho fenol (KIT WARMSTART FALAR COLOR LAMP 2X), que promove a mudança da cor da amostra de rosa (negativo) para amarelo (positivo), quando o pH do meio é alterado devido a geração e acúmulo de íons H⁺ durante a reação (AVELAR *et al.*, 2019).

A submissão dos produtos da LAMP na eletroforese em gel de agarose 2%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta (UV), revela resultado positivo definido com o aparecimento de um padrão típico em forma de escada no gel (Figura 21) (Ghasemian *et al.*, 2014).

Figura 21 -Detecção de DNA de *L. infantum* pela LAMP.



FONTE: Ghasemian *et al.* (2014)

Pista M, marcador de escada de DNA de 100 pb (*Roche Applied Science*); Colunas 1–3, 5 e 6, amostra de DNA de cada paciente; Coluna 7, controle positivo de *L. infantum*; Colunas 4 e 8, amostra de DNA de um ser humano saudável e água grau PCR (controle negativo), respectivamente.

A LAMP vem emergindo como um teste promissor, sendo aplicado com sucesso no diagnóstico de doenças causadas por diversos protozoários, como tripanossomíase africana, malária e giardíase. Diversos estudos demonstram a capacidade da LAMP em diagnosticar leishmaniose humana em diferentes amostras, com sensibilidade de 80% a 100% e especificidade de 94% a 100% (Gao *et al.*, 2015; Nzelu *et al.*, 2019; Verma *et al.*, 2017).

Entre 2009 e 2019, diversos estudos sobre o desenvolvimento de um sistema de LAMP para o diagnóstico da LV foram publicados na literatura. Dentre eles, podemos destacar o estudo desenvolvido por Takagi *et al.* (2009), que desenvolveu um sistema para identificar a espécie *L. donovani* e o estudo realizado no Brasil por Avelar *et al.* (2019), que realizou a otimização de um sistema de LAMP para diagnóstico da LV, utilizando o gene da proteína K26 (LAMP-K26) como alvo molecular e direcionando a reação especificamente para o complexo *L. donovani*.

Assim, o desenvolvimento de metodologias inovadoras para o diagnóstico mais preciso, rápido e com custo reduzido da LVC, superando as desvantagens e dificuldades dos testes atualmente utilizados, assume caráter crucial para a medicina veterinária, para a humana e para a saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Desenvolver uma prova de conceito para avaliar a LAMP-K26 para diagnóstico de LVCan.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a taxa de positividade dos testes TR DPP® e ELISA IDEXX em soro de cães que não apresentam sinais clínicos de LVCan, provenientes de um abrigo no município de Vespasiano - Minas Gerais;
- Determinar a taxa de soroconversão do teste ELISA IDEXX em soro de animais sem sinais clínicos de LVCan e reagentes no TR DPP®, no intervalo de três meses;
- Determinar as taxas de positividade para DNA de *L. infantum* pelas técnicas PCR (kDNA) e PCR-RFLP (*hsp70* e ITS-1) em fragmentos de pele de cães não reagentes e sem sinais clínicos de doença;
- Avaliar a capacidade de detecção de DNA de *L. infantum* pela LAMP-K26 em fragmentos de pele de cães naturalmente infectados, apresentando sorologia reagente (TR DPP® / ELISA IDEXX) e diferentes cargas parasitárias pela qPCR (kDNA);
- Determinar a acurácia da LAMP-K26 na detecção de DNA de *L. infantum* em pele de cães não infectados, com sorologia não reagente, e naturalmente infectados, com sorologia reagente, utilizando a técnica PCR-RFLP como padrão ouro.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA / Fiocruz), número de protocolo LW-76/12. Todas as coletas de amostras foram realizadas seguindo as normas de boas práticas em pesquisa científica, de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

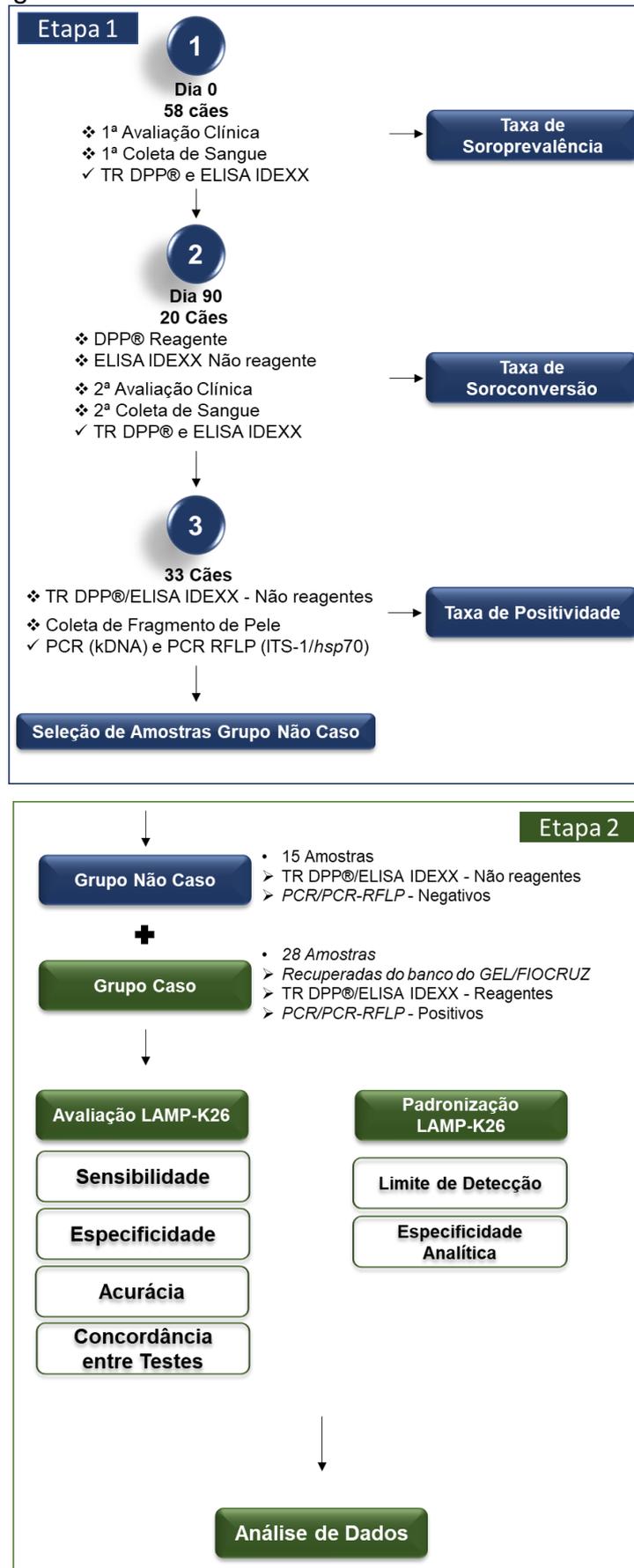
O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi devidamente explicado e assinado pela responsável pelo abrigo de animais, localizado no município de Vespasiano, Minas Gerais.

4.2 Delineamento do estudo

O estudo foi composto por duas etapas distintas, mas complementares (Figura 22). A primeira etapa constituiu de: (i) determinação da soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania* pelos testes TR DPP® e ELISA IDEXX; (ii) determinação da soroconversão após três meses pelo teste ELISA IDEXX; e (iii) determinação da taxa de positividade utilizando PCR (kDNA) e PCR-RFLP (ITS-1 e *hsp70*) em amostras de pele canina.

Na segunda etapa, o ensaio LAMP-K26 foi padronizado quanto ao limite de detecção e especificidade analítica e avaliado quanto à sensibilidade, especificidade, acurácia e concordância com PCR e PCR-RFLP. Para essa avaliação foi construído um painel de amostras divididas em dois grupos: (i) não caso, animais selecionados na primeira etapa do estudo, com resultados sorológicos não reagentes e moleculares negativos e (ii) caso, composto por amostras de cães recuperadas do banco do Grupo de Estudos em Leishmanioses – Fiocruz Minas (GEL), com resultados sorológicos reagentes e moleculares positivos, provenientes de fragmentos de pele de cães.

Figura 22 - Fluxograma do estudo.

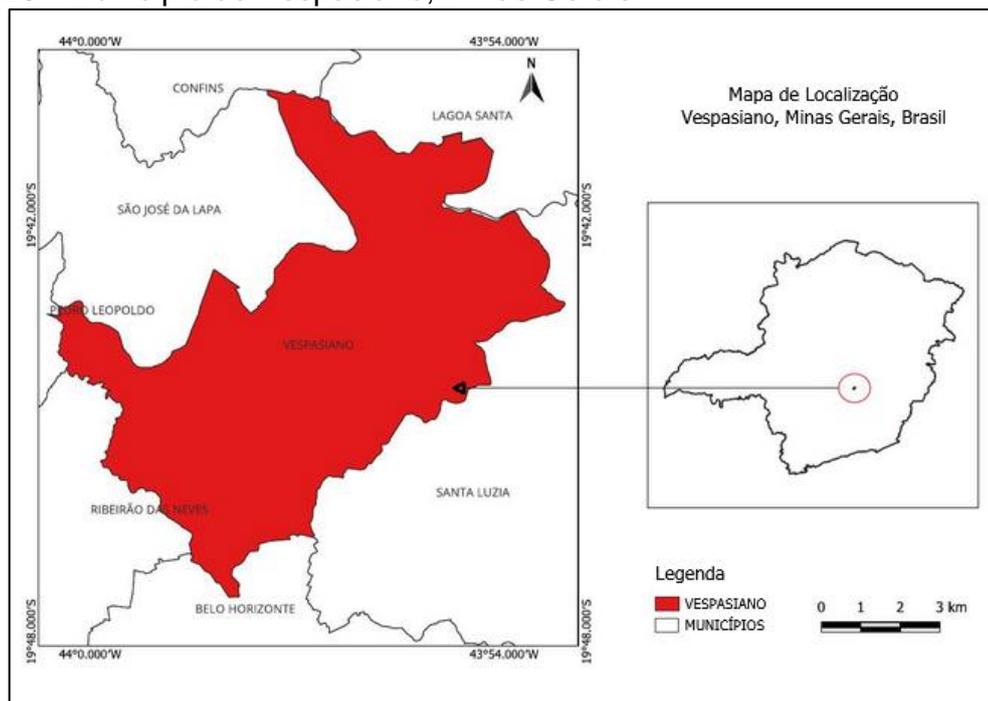


4.3 Etapa 1 - Pesquisa de anticorpo anti-*Leishmania* e detecção de DNA de *Leishmania* em cães sem sinais clínicos de doença

4.3.1 Área de estudo

O estudo foi realizado no município de Vespasiano (Figura 23), localizado no estado de Minas Gerais, Brasil. Com população estimada em 131.849 habitantes (IBGE, 2022), o município pertence à Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH), possui área total de 71,04 km², sendo 21,18 km² urbanizada e taxa de 91% de esgotamento sanitário adequado. O clima é definido como Tropical, com inverno seco, apresentando temperaturas médias de 21,6 °C e pluviosidade de 1039 mm (INMET, 2022).

Figura 23 - Município de Vespasiano, Minas Gerais.



4.3.2 População de Estudo

Foram selecionados cinquenta e oito cães (Figura 24) de um abrigo localizado no município de Vespasiano, RMBH, para participarem do estudo. O grupo era composto por trinta e quatro fêmeas e vinte e quatro machos, com idade variando entre 1 e 10 anos, todos sem raça definida (SRD), sem histórico de tratamento e/ou

vacinação para LVC e não apresentavam alterações físicas compatíveis com a doença.

Figura 24 - Cães de um abrigo no município de Vespasiano, Minas Gerais.



Todos os animais recebiam alimentação a base de ração seca tipo premium, vacinas polivalente e antirrábica anuais, realizavam prevenção contra LVC através do uso de produto tópico com permetrina (Defendog spray) a cada 7 dias e recebiam medicamentos para controle de ectoparasitas (mensalmente) e endoparasitas (semestralmente).

4.3.3 Coleta e processamento de amostras de sangue

Para a coleta do sangue total, os animais foram contidos de forma física, e 3 ml da amostra foram obtidas por venopunção em um dos membros (Figura 25), utilizando seringas de 3ml e agulha 0,8 x 25mm. As amostras foram transferidas para tubos coletores identificados, sem EDTA, e acondicionadas em caixas térmicas resfriadas para transporte.

Figura 25 - Coleta de sangue canino.



Na sede do Instituto René Rachou (IRR-Fiocruz Minas), as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos e o soro obtido (Figura 30) foi armazenado a -20°C para uso posterior.

4.3.4 Soroprevalência e soroconversão entre os cães do abrigo

Inicialmente foram utilizados os kits TR DPP® e ELISA IDEXX para determinação da soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania* na população estudada de cinquenta e oito animais.

Posteriormente, para determinação da taxa de soroconversão no ELISA IDEXX, vinte animais com resultado reagente no TR DPP® e não reagente no ELISA IDEXX, na primeira coleta (D0), foram reavaliados após 90 dias (D90), sendo realizada uma nova avaliação clínica para certificação de que os animais não tinham desenvolvido sinais físicos compatíveis com LVC, e realizada nova coleta de amostras de sangue total para repetição dos testes sorológicos TR DPP® e ELISA.

A execução dos testes foi realizada de acordo com as instruções fornecidas pelos fabricantes. Os detalhes estão descritos a seguir.

4.3.4.1 TR DPP®

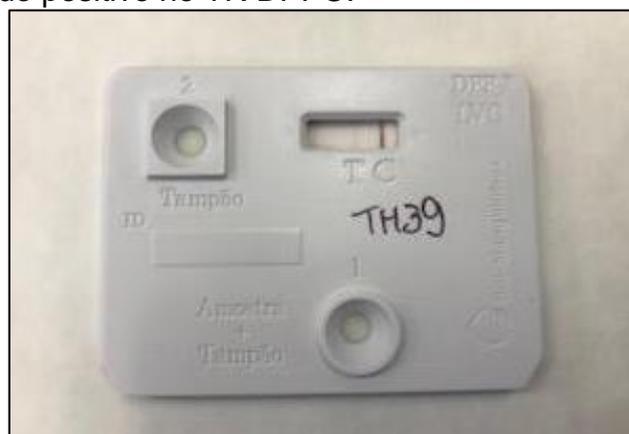
Seguindo o protocolo do fabricante do TR DPP® (Figura 31), 5 µL da amostra de soro canino e 2 gotas de tampão fornecido no kit foram adicionados no poço 1 do dispositivo e aguardado o tempo de pausa de 5 minutos.

Figura 26 - Kit TR DPP®.



Após o desaparecimento das linhas controle (C) e teste (T), foram adicionadas 4 gotas de tampão no poço 2 e aguardado o tempo de pausa de 10 a 15 minutos para leitura do resultado. Os testes foram considerados positivos (Figura 27) quando visualizadas duas linhas vermelhas (C e T) no visor e negativos caso houvesse apenas uma linha vermelha (C).

Figura 27 - Resultado positivo no TR DPP®.



4.3.4.2 ELISA IDEXX

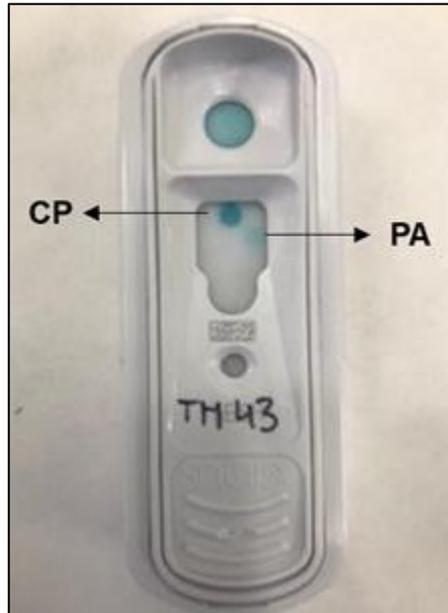
Seguindo o protocolo do fabricante do teste ELISA IDEXX (Figura 28), duas gotas da amostra de soro e seis gotas do conjugado fornecido no kit foram misturados por inversão de três a cinco vezes no tubo coletor.

Figura 28 - Kit ELISA IDEXX (SNAP® *Leishmania* IDEXX).



O dispositivo *snap* foi posicionado em superfície horizontal, a mistura adicionada no orifício receptor e aguardado o tempo de pausa de seis minutos, até que a amostra fluísse pela janela de resultados e alcançasse o círculo de ativação. O *snap* foi ativado e aguardado o tempo de pausa de seis minutos para visualização dos resultados. Os testes foram considerados positivos quando visíveis o controle positivo (CP) e o ponto de amostra (PA) de *Leishmania* (Figura 29) e negativos quando visualizado apenas o CP.

Figura 29 - Resultado positivo no kit SNAP® *Leishmania* (ELISA IDEXX).



4.3.5 Detecção de DNA e identificação da espécie de *Leishmania* entre os cães com sorologia não reigente

Nessa etapa, apenas os cães com sorologia não reigente nos testes TR DPP® e ELISA-IDEXX foram selecionados para realizar o diagnóstico molecular. Desses animais foram coletados fragmentos de pele para extração de DNA e realização dos testes moleculares (PCR/kDNA e PCR-RFLP/ITS-1 e *hsp70*). O principal objetivo foi definir os cães que seriam incluídos no grupo não caso para avaliação da acurácia da LAMP-K26 no diagnóstico da LVC.

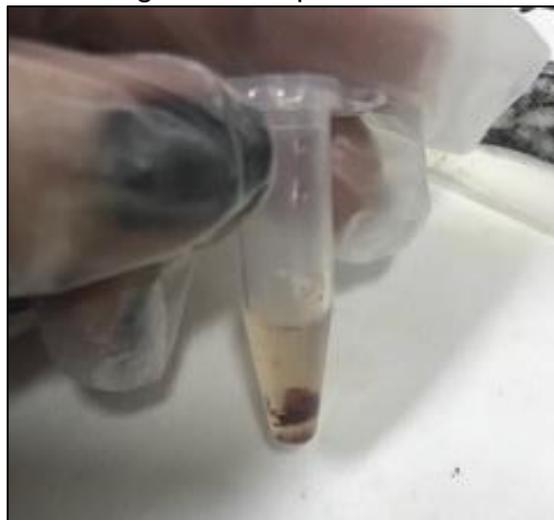
Para coleta de fragmentos de pele, os animais foram sedados e anestesiados com os fármacos acepromazina e cetamina, ambos por via intramuscular, nas doses de 0,05mg/kg e 2 mg/kg, respectivamente.

As amostras foram então coletadas da borda interna do pavilhão auricular, via *punch* (5mm) (Figura 30), e transferidas para frascos coletores contendo RNA Later (Figura 31), previamente identificados e, então, acondicionados em caixas térmicas resfriadas para transporte.

Figura 30 - Coleta de fragmento de pele em cão via *punch* (5mm).



Figura 31 - Frasco contendo fragmento de pele coletado de cão em RNA *Later*.



Os fragmentos de pele foram pesados e separadas partes de aproximadamente 20mg para maceração com lâmina de bisturi número 20. Em seguida foi utilizado o kit *Qiagen® Gentra Puregene Tissue* para extração do material genético, seguindo o protocolo do fabricante. As amostras obtidas no processo de extração passaram por quantificação de DNA pelo equipamento *NanoDrop™* e foram armazenadas a -20° C.

4.3.5.1 PCR convencional

A PCR foi realizada de acordo com as condições descritas por DEGRAVE *et al.* (1994). A reação foi realizada utilizando os seguintes *primers* específicos do gênero *Leishmania*: (i) 5' (C/G) (C/G) (G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' e (ii) 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3', para amplificação da sequência conservada genérica dos minicírculos de kDNA de 120 pb. O volume final da solução utilizada foi de 25 µL, sendo 5 µL de DNA molde [10 ng/µL]; 2,5 µL de tampão PCR *buffer* 10x; 1 µL de dNTPs [10 mM]; 1 µL de *primer forward* [10 pmol/µL]; 1 µL de *primer reverse* [10 pmol/µL]; 0,75 µL de MgCl₂ [50mM]; 0,14 µL de Taq platinum [5 U/µL] e 13,61 µL de água.

As condições de termociclagem foram desnaturação inicial a 94°C por 30 segundos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; a extensão final ocorreu a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2%, com coloração pelo brometo de etídio [1mg/µL].

Foram incluídos na reação controle negativo (mistura sem DNA/controlado do processo extração) e controle positivo, com cepas referências de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), extraídas nas mesmas condições já descritas.

4.3.5.2 PCR-RFLP

A PCR direcionada ao alvo *hsp70* foi realizada de acordo com as condições descritas por Garcia *et al.* (2004), para amplificação de fragmento de 1300 pb com os seguintes *primers*: (i) *hsp70sent* 5'- GAC GGT GCC TGC CTA CTT CAA -3' e (ii) *hsp70ant*- 5'- CCG CCC ATG CTC TGG TAC ATC -3'. O volume da solução final foi de 25 µL (5 µL do DNA molde [10 ng/µL]; 2,5 µL de tampão PCR *buffer* 10x; 0,5 µL de dNTPs [10 mM]; 1,25 µL de DMSO; 1 µL de *primer forward* [10 pmol/µL]; 1 µL de *primer reverse* [10 pmol/µL]; 0,75 µL de MgCl₂ [50mM]; 0,25 µL de Taq polimerase [5 U/µL] e 12,75 µL de água.

As condições de termociclagem foram desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 35 repetições de desnaturação a 94°C por 30 segundos,

anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos; a extensão final ocorreu a 72°C por 10 minutos.

A PCR direcionada ao alvo ITS-1 foi realizada de acordo com as condições descritas por EL TAIL *et al.* (2000), com os seguintes *primers*: (i) LITSR – 5' CTG GAT CAT TTTCCG ATG 3' e (ii) L5.8S – 5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3', para amplificação de fragmento de 300 a 350 pb. O volume final da solução utilizada foi de 25 µL, sendo 5µL de DNA molde [10 ng/µL]; 2.5 µL de tampão PCR *buffer* 10x; 0,5 µL de dNTPs [10 mM]; 1.25 µL de DMSO; 1.25 µL de *primer forward* [10 pmol/µL]; 1.25 µL de *primer reverse* [10 pmol/µL]; 0.75 µL de MgCl₂ [50 mM]; 0.25 µL de Taq polimerase [5 U/µL] e 12.25 µL de água. As condições de termociclagem foram desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; a extensão final ocorreu a 72°C por 10 minutos.

Os produtos amplificados na PCR (*hsp70* e ITS-1) foram submetidos a RFLP, usando a endonuclease de restrição HaeIII, utilizando 10 µL dos produtos da PCR e 5 µL da solução contendo 1,5 µL de tampão 10x [15 mM]; 1 µL da enzima HaeIII [10 U/µL] e 2,5 µL de água. A solução foi incubada à temperatura de 37°C durante 2 horas e os resultados foram analisados após a realização da eletroforese em gel de agarose a 2,0%, com coloração pelo brometo de etídio [1mg/µL]. Os perfis de restrição obtidos pela digestão da enzima foram comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR-RFLP de cepas referência de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) para controle positivo, extraídas nas mesmas condições já descritas, e mistura sem DNA/controle do processo de extração para controle negativo.

4.4 Etapa 2 - Padronização e avaliação da acurácia da LAMP-K26 no diagnóstico da LVCan

4.4.1 LAMP-K26

As reações de LAMP-K26 foram realizadas com *primers* (Figura 32) previamente desenhados que amplificam uma sequência do gene K26 e são

específicos para o complexo *L. donovani* (AVELAR *et al.*, 2019). No presente trabalho, com o objetivo de facilitar a leitura dos resultados, optamos por utilizar os *primers* com o kit WarmStart Color LAMP 2x (NEW ENGLAND BIOLABS, NEW ENGLAND). Desse modo, a leitura dos resultados ocorreu de forma visual, a partir da alteração de cor das amostras, quando ocorreu amplificação do material genético: amarelo (positivo) e rosa (negativo).

Figura 32 - Localização dos *primers* LAMP no gene K26 do complexo *L. donovani*.

Primer*	Sequence 5' - 3'	bp
K26_F3	GACGGCCGTACACAGAAA	18
K26_B3	GGTTCACATGCGAGGATG	18
K26_FIP	CCACGTTGTGTCCATCTTCGT-CTAAGGAGGATGAGAATCTGC	42
K26_BIP	CGGCAATGAGGATGGTAACGAT-GACGCAGTGCCTAGTTG	40
K26_FLP	TCTTCTCCTGCGCATTC	18
K26_BLP	GATCAGCCGAAGGAGCAG	18

* F3, forward outer primer; B3, backward outer primer; FIP, forward inner primer; BIP, backward inner primer; FLP, forward loop primer; BLP, backward loop primer.

FONTE: Avelar, *et al.* (2019)

4.4.2 Padronização da reação LAMP-K26

As reações de LAMP-K26 foram realizadas com 12,5 µL de Wst Color LAMP 2x (NEW ENGLAND BIOLABS, NEW ENGLAND), 2,5 µL do mix de *primers* [10x], 8 µL de água e 2 µL de cada amostra, contendo 10 ng de DNA total, totalizando um volume final de 25 µL. O mix de *primers* [10x] continha 2 µL [0,2 µM] de cada *primer* externo (F3 e B3), 8 µL [1,6 µM] de cada *primer* interno (FIP e BIP) e 4 µL [0,4 µM] de cada *loop primer* (LFP e LBP) somados a 72 µL de tampão TE 1X. As reações foram realizadas em banho-maria (Lindberg/Blue®) a 65°C ± 1°C (Figura 33), seguida por incubação em gelo por 1 minuto para potencializar as cores, facilitando a leitura dos resultados. Para controle positivo da reação, foram utilizadas amostras de cepas

referência de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e para controle negativo, água em substituição à amostra de DNA.

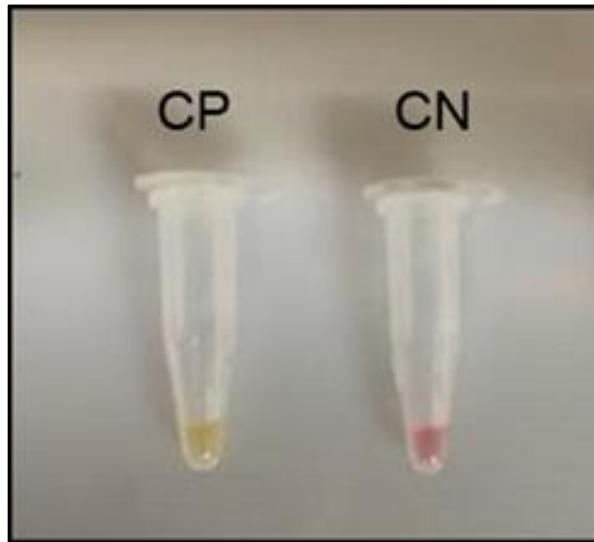
Figura 33 – Banho-maria utilizado na reação LAMP-K26.



A influência do tempo de incubação das reações de LAMP-K26 sobre o limite de detecção e a especificidade analítica foi avaliada considerando 30, 35 e 40 minutos de reação. Essa etapa foi utilizada para definir o tempo de reação utilizado na avaliação de acurácia.

Após a incubação nos tempos descritos, as soluções foram avaliadas visualmente por dois observadores independentes. As amostras com concordância de visualização da cor rosa, pelos dois pesquisadores, foram consideradas negativas e nas cores amarelo ou laranja, positivas (Figura 34). Em caso de discordância entre as visualizações dos pesquisadores, foi previamente definido que uma nova reação LAMP-K26 seria realizada.

Figura 34 - Visualização dos resultados da reação LAMP-K26, por meio de alteração de cor da amostra.



Legenda. CP: controle positivo, indicado pela cor amarela. CN: controle negativo, indicado pela cor rosa-salmão.

4.4.3 Limite de detecção

Para avaliação do limite de detecção da LAMP-K26, foi construída uma curva de diluição de fator 10 com DNA de *L. infantum*, proveniente de cultura de referência (MHOM/BR/74/PP75). A concentração da solução inicialmente utilizada era de 1 ng/ μ L de DNA genômico, resultando em soluções com concentrações de 100 pg/ μ L, 10 pg/ μ L, 1 pg/ μ L, 100 fg/ μ L, 10 fg/ μ L e 1 fg/ μ L. As amostras foram avaliadas em três diferentes tempos de incubação: 30, 35 e 40 minutos. O produto da reação LAMP-K26 foi aplicado em gel de poliacrilamida para realização da eletroforese e visualização das bandas.

4.4.4 Especificidade analítica

Para avaliar a especificidade analítica da LAMP-K26, foram utilizadas amostras de diferentes espécies de *Leishmania*, provenientes de culturas de referência: *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). As amostras foram avaliadas visualmente em três diferentes tempos de incubação: 30, 35 e 40

minutos, com o objetivo de determinar o tempo ideal de incubação para diagnóstico de *L. infantum*. O produto da reação LAMP-K26 foi aplicado em gel de poliacrilamida para realização da eletroforese e visualização das bandas.

4.4.5 Avaliação de acurácia e concordância entre testes moleculares

Na prova de conceito, foi realizada uma avaliação de desempenho do ensaio LAMP-K26 em painel de DNA extraído de amostras de fragmento de pele de cães. Todas as amostras foram randomizadas e codificadas por um membro do estudo que não esteve envolvido na execução dos testes diagnósticos e o código foi aberto somente após a execução de todos os testes. A leitura dos testes foi feita por dois observadores independentes.

Com o propósito de avaliar a especificidade, foram utilizadas 15 amostras provenientes dos cães avaliados na etapa 1, com resultado não reagente nos testes sorológicos (TR DPP® e ELISA IDEXX) e negativos nos testes moleculares PCR (alvo kDNA) e PCR-RFLP (alvos *hsp70* e ITS-1).

Para avaliação da sensibilidade do ensaio de LAMP-K26, foram utilizadas 28 amostras externas ao estudo, coletadas previamente para outra pesquisa do GEL/IRR-Fiocruz Minas. Os animais eram provenientes do UVZ do município de Sabará, RMBH. Todos os cães apresentavam sinais físicos compatíveis com LVC, resultado reagente nos testes sorológicos TR DPP® e ELISA-Biomanguinhos e as amostras eram positivas na PCR-RFLP (alvos *hsp70* e ITS-1), caracterizadas como *L. infantum*. Essas amostras também foram utilizadas para realização da qPCR (alvo kDNA) para posterior avaliação comparativa da performance da LAMP-K26 em diferentes cargas parasitárias.

4.4.6 PCR quantitativa

As amostras de DNA foram submetidas à qPCR utilizando-se os mesmos iniciadores descritos na seção de PCR convencional (Degraive *et al.*, 1994) que amplificam um fragmento de 120 pb da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania* sp.

As reações de qPCR foram preparadas em microplacas (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, Thermo Fisher Scientific), sendo adicionados para cada reação 12,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 10 pmoles/µL de cada iniciador, 5,0 µL de DNA a 10 ng/µL e 6 µL de água estéril, completando o volume final para 25 µL. Foi utilizado o aparelho Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min.

Em todas as reações, foram incluídos controle positivo (DNA de *L. infantum*) e negativo (reagentes da extração de DNA sem adição de material biológico). A análise de Melting foi realizada em um ciclo adicional com aumento da temperatura de 60°C a 95°C a uma taxa de 0,3°C por segundo, com aquisição contínua de fluorescência. A quantificação da carga parasitária foi realizada a partir da comparação com uma curva padrão de diluição seriada do DNA de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), partindo da concentração de 1 ng até 1x10⁻⁶ ng (fator de diluição 1:10).

Para a quantificação, 83,15 fg de DNA de *Leishmania* foram considerados como equivalentes a um parasito (Jara *et al.*, 2013). A carga parasitária foi determinada a partir da seguinte fórmula: (equivalentes de DNA do parasito por reação / quantidade de DNA de tecido por reação) x 10³, expresso como o número de parasitos *Leishmania* por µg de DNA de tecido (Sevilha-Santos *et al.*, 2019).

4.5 Análise de Dados

As seguintes medidas de desempenho foram calculadas: a) sensibilidade, que corresponde ao número de casos avaliados com resultado positivo dividido pelo total de casos verdadeiros; b) especificidade, que corresponde ao número de controles avaliados com resultado negativo, dividido pelo total do grupo controle; c) acurácia, que é definida pelo somatório dos verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, dividido pelo total de casos avaliados.

Os cálculos foram realizados utilizando-se uma tabela de contingência 2x2, com binomial exato em um intervalo de confiança de 95%, e o teste do qui-quadrado foi empregado para comparação; as diferenças significativas foram consideradas com p

<0,05. O grau de concordância entre os testes sorológicos (TR-DPP e ELISA-IDEXX) foi estimado pelo índice kappa (IC 95%).

Além disso, o índice kappa (IC 95%) também foi utilizado na comparação dos resultados dos testes moleculares (PCR *hsp70*, PCR *kDNA*, PCR *ITS-1* e LAMP-K26) e classificado de acordo com a escala de Fleiss: <0,00, ruim; 0,00-0,20, leve; 0,21-0,40, razoável; 0,41-0,60, moderado; 0,61-0,80, substancial; 0,81-1,00, concordância quase perfeita (Landis e Koch, 1977). A carga parasitária foi categorizada como “baixa” ou “alta” a partir da mediana baseada nos dados de distribuição (teste Kolmogorov-Smirnov).

5 RESULTADOS

5.1 Soroprevalência e soroconversão em cães de abrigo

Na Tabela 1, foram analisados os resultados conjuntos dos testes TR DPP® e ELISA-IDEXX. Nossos resultados indicaram soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania* de 39,7% (23/58) no TR DPP® e 8,6% (5/58) no ELISA IDEXX. A taxa de concordância entre as sorologias foi de 62,1% (36/58) e índice kappa de 0,085, indicando uma concordância “leve”.

Tabela 1: Resultados dos testes sorológicos em amostras de soro canino sem sinais clínicos de LVC no dia 0.

TR-DPP®	ELISA-IDEXX				Concordância		
	Reagente		Não reagente		Observada		Kappa (IC a 95%)
	N	%	N	%	N	%	0,085 (0,09- 0,27)
Reagente	3	5,2	20	34,5	36	62,1	
Não reagente	2	3,4	33	56,9			
Total	5		53				

Na avaliação de soroconversão em D90, das 20 amostras com resultado reagente no TR DPP® e não reagente no ELISA IDEXX no D0, todas permaneceram reagentes no TR DPP® e 11 amostras se tornaram reagentes no ELISA IDEXX, indicando uma taxa de soroconversão de 55%.

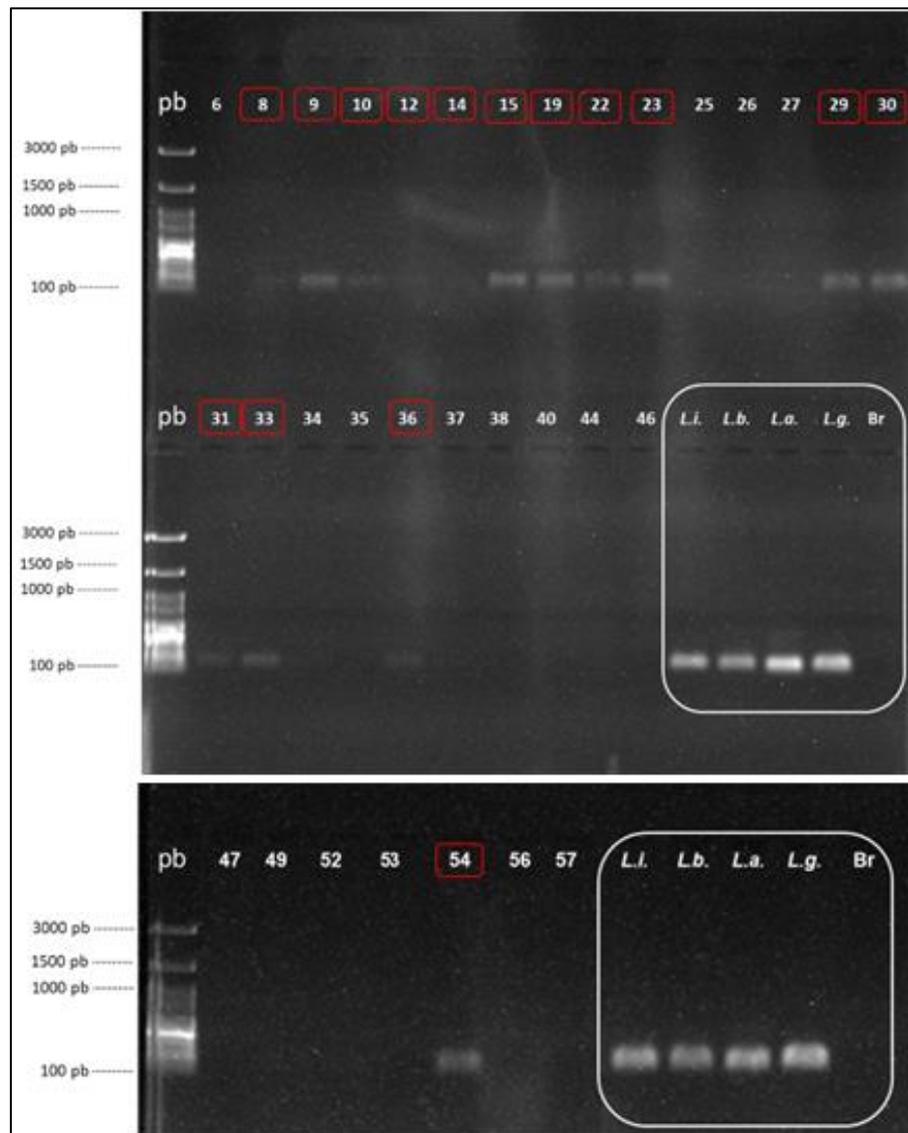
5.2 Detecção de DNA de *Leishmania* e caracterização em cães com sorologia não reagente

Dos 58 animais inicialmente avaliados no grupo não caso, 33 foram selecionados para a próxima etapa do estudo e coleta de fragmentos de pele, por

apresentarem sorologias não reagentes nos testes TR DPP® e ELISA IDEXX. Porém, um dos animais foi adotado, portanto, excluído do estudo, restando 32 cães para realização dos testes moleculares (PCR e PCR-RFLP).

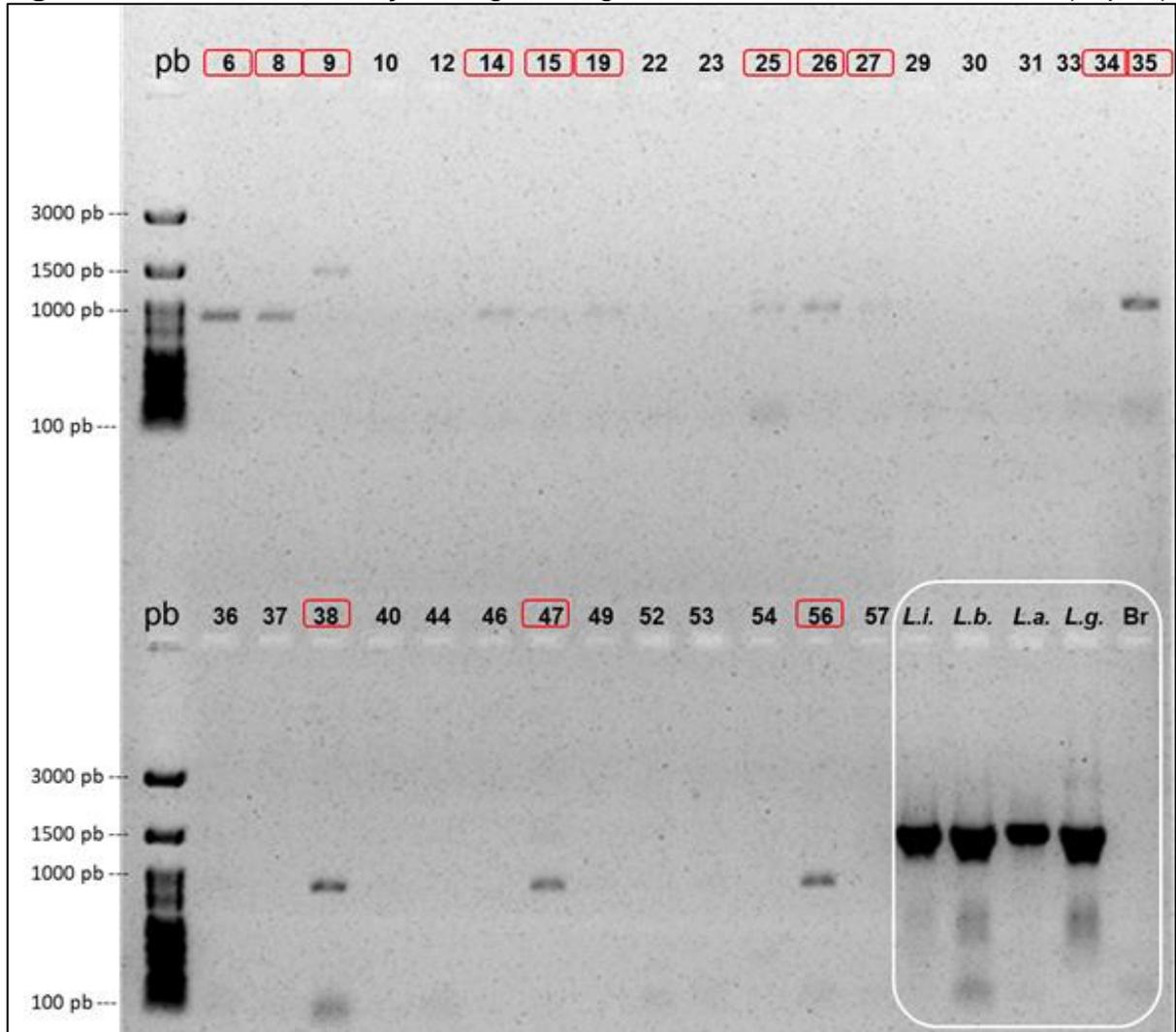
Os resultados da PCR convencional realizada nas amostras de pele demonstraram taxas de positividade de 46,9% (15/32) para o alvo kDNA (Figura 35); 3,1% (1/32) para o alvo *hsp70* (Figura 36) e 37,5% (12/32) para o alvo ITS-1 (Figura 37).

Figura 35 - Fotodocumentação de gel de agarose 2% da PCR convencional (kDNA).



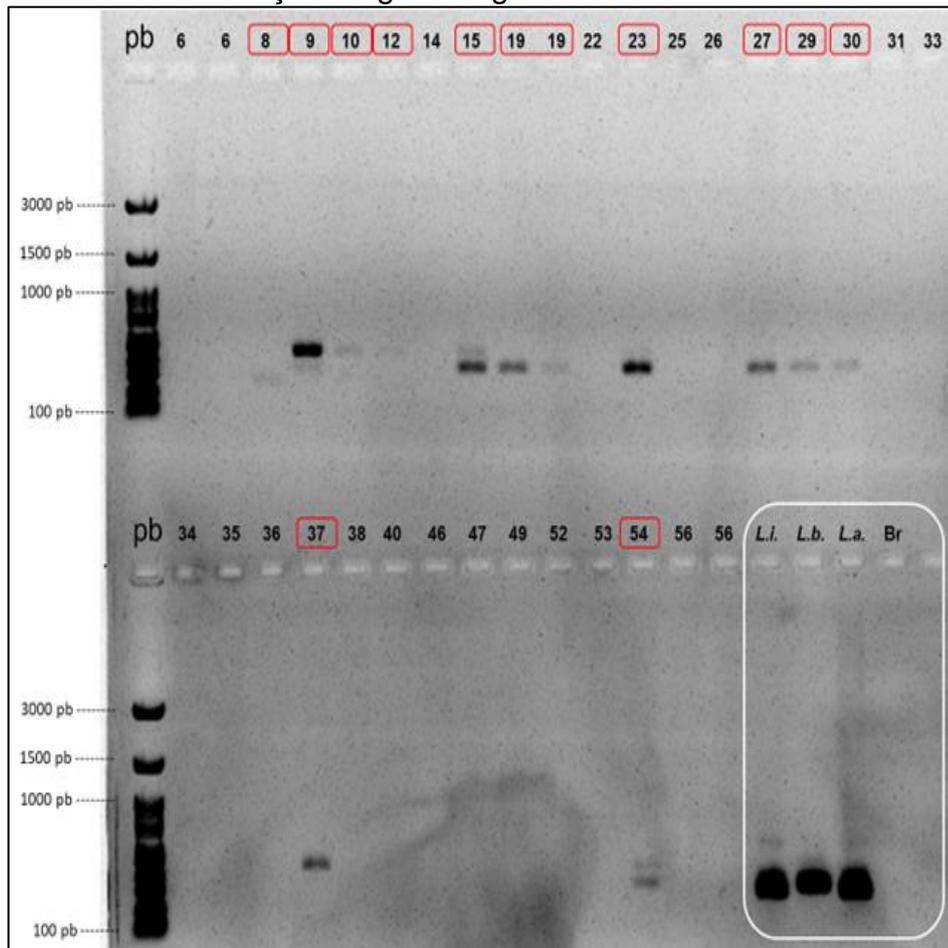
Legenda: Amostras avaliadas identificadas pelos números indicados. Controles positivos: *L. infantum* (L.i.); *L. braziliensis* (L.b.); *L. amazonensis* (L.a.); *L. guyanensis* (L.g.). Controle negativo: branco de extração (Br.). Marcações em vermelho indicam as 15 amostras que apresentaram amplificação similar aos controles positivos.

Figura 36 - Fotodocumentação de gel de agarose 2% da PCR convencional (*hsp70*).



Legenda: Amostras avaliadas identificadas pelos números indicados. Controles positivos: *L. infantum* (*L.i.*); *L. braziliensis* (*L.b.*); *L. amazonensis* (*L.a.*); *L. guyanensis* (*L.g.*). Controle negativo: branco de extração (Br.). Marcações em vermelho indicam as 14 amostras que apresentaram algum tipo de amplificação, porém apenas a amostra 9 apresentou padrão de bandas similar aos controles positivos.

Figura 37 - Fotodocumentação de gel de agarose 2% da PCR convencional (ITS-1).

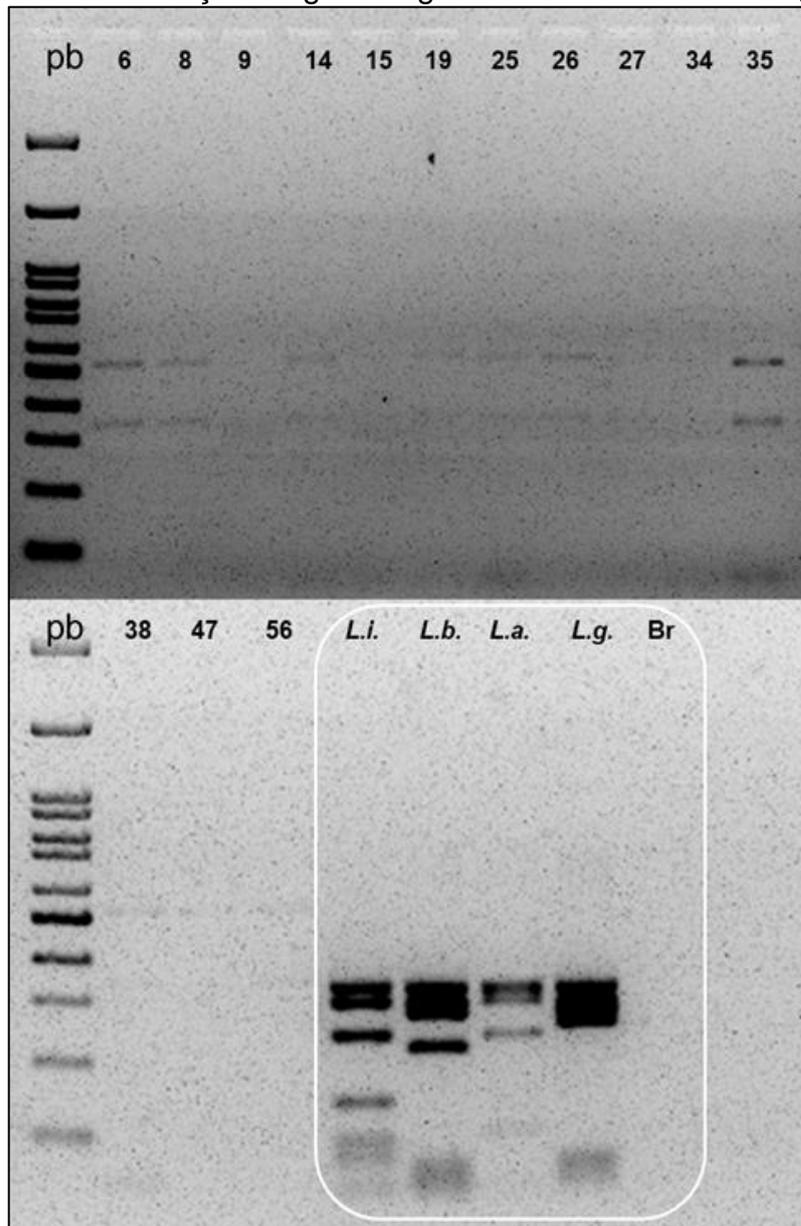


Legenda: Amostras avaliadas identificadas pelos números indicados. Controles positivos: *L. infantum* (L.i.); *L. braziliensis* (L.b.); *L. amazonensis* (L.a.). Controle negativo: branco de extração (Br.) Marcações em vermelho indicam as 12 amostras marcadas em vermelho apresentaram amplificação similar aos controles positivos. A amostra 19 está em duplicata.

Na PCR convencional, das 32 amostras analisadas, 3,1% (1/32) foram positivas nos três alvos utilizados, 28,1% (9/32) foram positivas em dois alvos, 21,9% (7/32) foram positivas em apenas um alvo e 46,9% (15/32) foram negativas em todos os alvos.

Os produtos da PCR convencional foram submetidos a RFLP, utilizando os alvos *hsp70* e ITS-1. Apesar da ocorrência de amplificação observada na PCR convencional (*hsp70*), é possível observar que, na PCR-RFLP (*hsp70*), as amostras não apresentaram amplificação compatível com os padrões de bandas dos controles positivos de *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, e, portanto, foram consideradas negativas para *L. infantum* (amplificações inespecíficas) (Figura 38).

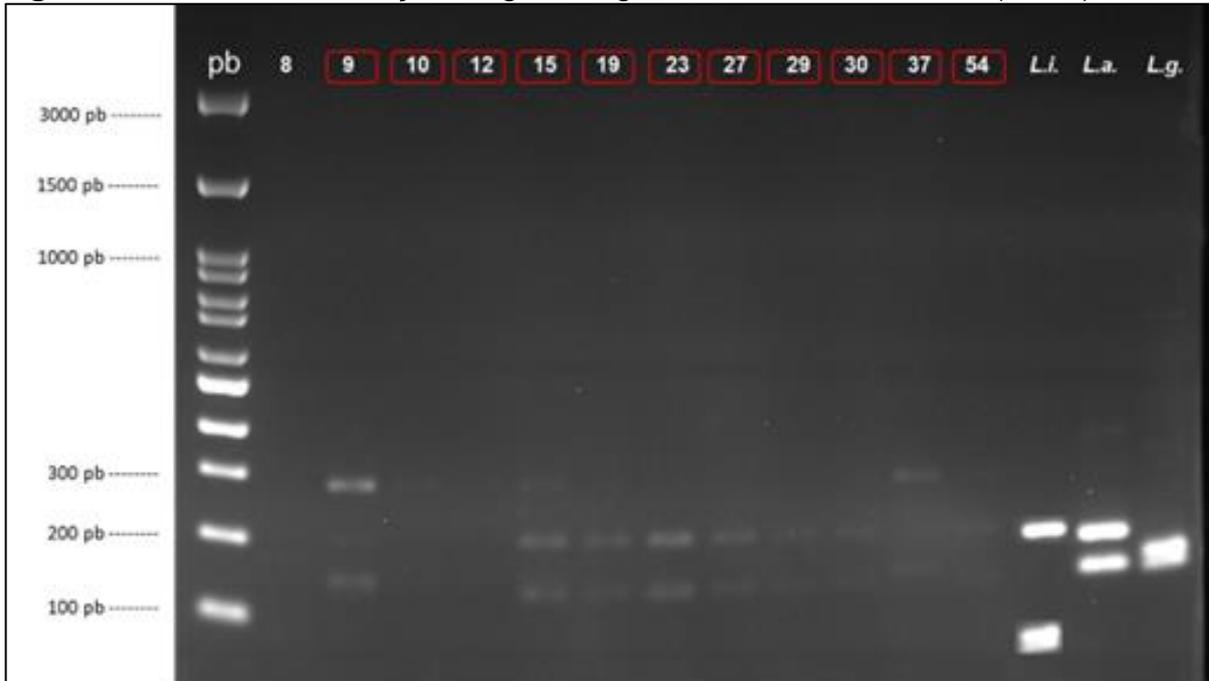
Figura 38 - Fotodocumentação de gel de agarose 2% da PCR-RFLP (*hsp70*).



Legenda: Amostras avaliadas identificadas pelos números indicados. Controles positivos: *L. infantum* (*L.i.*); *L. braziliensis* (*L.b.*); *L. amazonensis* (*L.a.*); *L. guyanensis* (*L.g.*). Controle negativo: branco de extração (*Br.*)

Situação similar ocorreu na PCR-RFLP (ITS-1) na qual as amostras avaliadas não apresentaram padrão de restrição de bandas compatível com os controles positivos de *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, sendo portanto, consideradas negativas (amplificações inespecíficas) (Figura 39).

Figura 39 - Fotodocumentação de gel de agarose 2% da PCR-RFLP (ITS-1).



Legenda: Amostras avaliadas identificadas pelos números indicados. Controles positivos: *L. infantum* (*L.i.*); *L. amazonensis* (*L.a.*); *L. guyanensis* (*L.g.*). Controle negativo: branco de extração (Br.).

A tabela 2 demonstra os resultados obtidos pela PCR e PCR-RFLP em todas as amostras avaliadas, com os diferentes alvos utilizados.

Tabela 2: Resultados de PCR convencional (alvos kDNA, *hsp70* e ITS-1) e PCR-RFLP (alvos *hsp70* e ITS-1) em amostras provenientes de cães sem sinais clínicos de LVC e não reagentes no TR DPP® e ELISA IDEXX.

Metodologia	PCR (kDNA)	PCR (<i>hsp70</i>)	PCR-RFLP (<i>hsp70</i>)	PCR (ITS-1)	PCR -RFLP (ITS-1)
Amostras					
6	N	N*	N*	N	-
8	+	N*	N*	+	N
9	+	+	N*	+	N*
10	+	N	-	+	N*
12	+	N	-	+	N*
14	+	N*	N*	N	-
15	+	N*	N*	+	N*
19	+	N*	N*	+	N*
22	+	N	-	N	-
23	+	N	-	+	N*
25	N	N*	N*	N	-
26	N	N*	N*	N	-
27	N	N*	N*	+	N*
29	+	N	-	+	N*
30	+	N	-	+	N*
31	+	N	-	N	-
33	+	N	-	N	-
34	N	N*	N*	N	-
35	N	N*	N*	N	-
36	+	N	-	N	-
37	N	N	-	+	N*
38	N	N*	N*	N	-
40	N	N	-	N	-
44	N	N	-	N	-
46	N	N	-	N	-
47	N	N*	N*	N	-
49	N	N	-	N	-
52	N	N	-	N	-
53	N	N	-	N	-
54	+	N	-	+	N*
56	N	N*	N*	N	-
57	N	N	-	N	-
TOTAL	15	1	0	12	0

Legenda: (+)=positivo; (N)=negativo; (N*)=negativo com amplificação inespecífica; (-)=não realizado
Amostras em negrito foram selecionadas para o grupo não caso do estudo.

Das 32 amostras avaliadas pela PCR e PCR-RFLP, 15 amostras com resultados negativos para todos os alvos utilizados (em negrito na Tabela 3) foram selecionadas para o grupo controle negativo (não caso) e composição do painel de amostras para avaliação da LAMP-K26.

5.3 Limite de detecção, especificidade analítica e tempo de reação da LAMP-K26

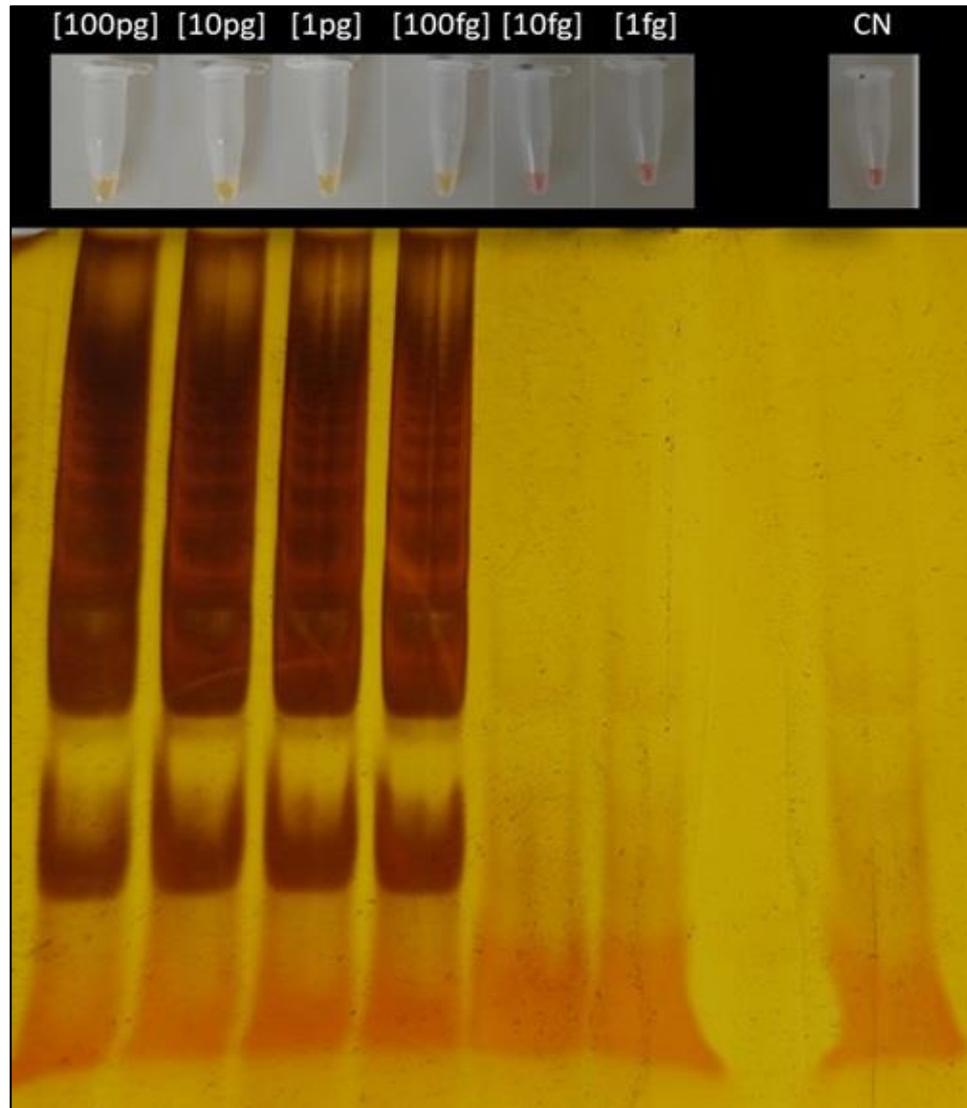
Após 30 minutos de reação, o teste LAMP-K26 foi capaz de detectar até 100fg do DNA de *L. infantum* de todas as amostras avaliadas. Após 35 minutos de reação, o limite de detecção passou para 10fg e, com 40 minutos, para 1fg de DNA de *L. infantum* (Tabela 3). A realização da eletroforese em gel de poliacrilamida do produto da reação revelou o aparecimento de um padrão típico em forma de escada no gel (Figura 40).

Tabela 3: Comparação de resultados da LAMP-K26, em amostras com diferentes concentrações de *L. infantum*, em três tempos de reação.

Concentração	30 minutos	35 minutos	40 minutos
100pg	amarelo (+)	amarelo (+)	amarelo (+)
10pg	amarelo (+)	amarelo (+)	amarelo (+)
1pg	amarelo (+)	amarelo (+)	amarelo (+)
100fg	amarelo (+)	amarelo (+)	amarelo (+)
10fg	rosa (-)	amarelo (+)	amarelo (+)
1fg	rosa (-)	rosa (-)	amarelo (+)
CN	rosa (-)	rosa (-)	rosa (-)

Legenda: controle negativo (CN).

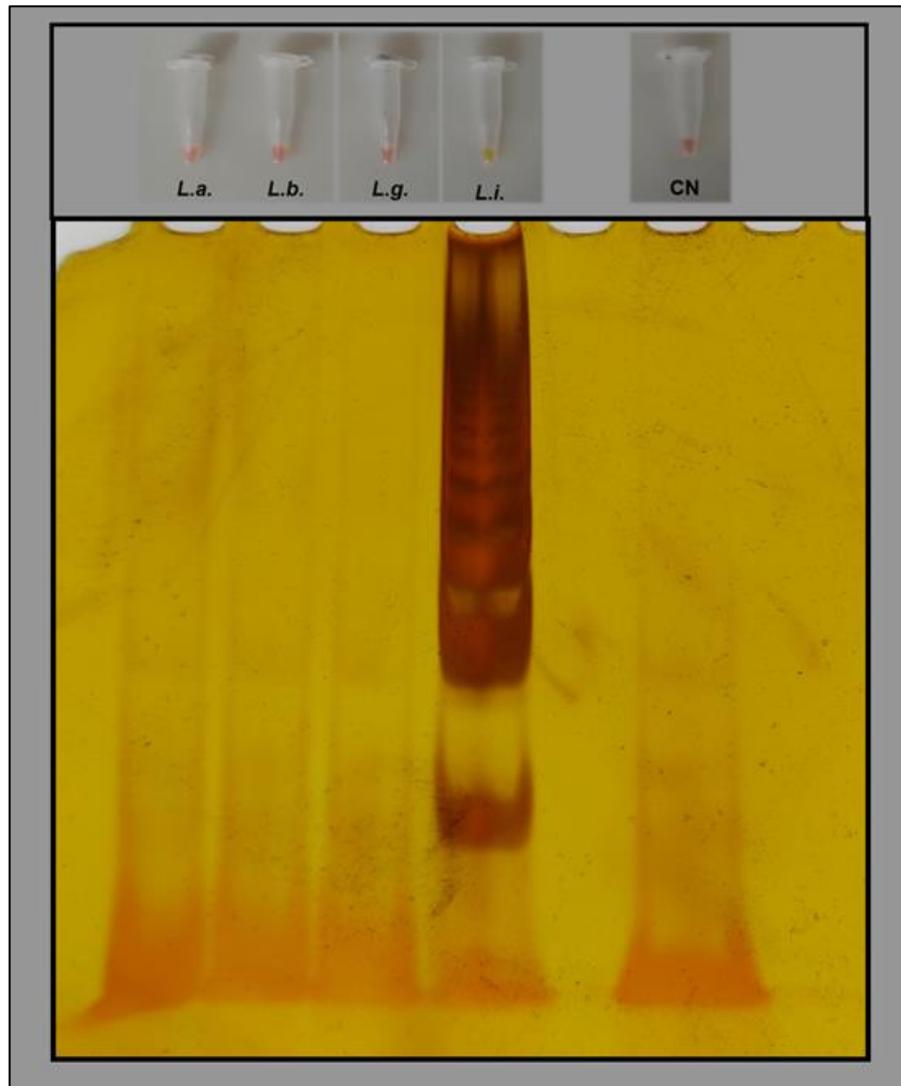
Figura 40 - Visualização dos resultados do ensaio LAMP-K26 e eletroforese em gel de poliácridamida dos produtos da reação, para avaliação de limite de detecção para DNA de *L. infantum*.



Legenda: Amostras avaliadas com diferentes concentrações de DNA de cepa de referência de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) – [100pg], [10pg], [1pg], [100fg], [10fg] e [1fg]. Controle negativo – CN.

Na avaliação de especificidade analítica, em amostras com DNA de referência de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), o ensaio LAMP-K26 apresentou amplificação apenas do DNA de *L. infantum* no tempo de 30 minutos (Figura 41), porém, após 35 minutos de reação, houve mudança de coloração (de rosa para amarelo), no tubo contendo DNA de *L. braziliensis* (Tabela 4). Dessa forma, foi determinado o tempo de reação de 30 minutos para o cálculo de sensibilidade e especificidade no painel de amostras.

Figura 41 - Visualização dos resultados do ensaio LAMP-K26 e eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos da reação para avaliação de especificidade analítica, com diferentes espécies de *Leishmania*.



Legenda: Amostras avaliadas com diferentes concentrações de DNA de cepas de referências de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) e *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75). Controle negativo – CN.

Tabela 4: Avaliação de sensibilidade analítica da LAMP-K26.

Amostra	30 minutos	35 minutos
<i>L. infantum</i>	amarelo(+)	amarelo(+)
<i>L. braziliensis</i>	rosa (-)	amarelo(+)
<i>L. amazonensis</i>	rosa (-)	rosa (-)
<i>L. guyanensis</i>	rosa (-)	rosa (-)
CN	rosa (-)	rosa (-)

Legenda: controle negativo (CN).

5.4 Prova de conceito, carga parasitária e análise de concordância

Os resultados da reação LAMP-K26 nas 15 amostras do grupo não caso estão descritas na Tabela 5, apenas uma amostra apresentou resultado positivo na reação LAMP-K26.

Tabela 5: Resultados dos testes moleculares e reação LAMP-K26 nas amostras do grupo não caso.

Metodologia	PCR (kDNA)	PCR (hsp70)	PCR-RFLP (hsp70)	PCR (ITS-1)	PCR -RFLP (ITS-1)	LAMP
Amostras						
6	N	N*	N*	N	-	N
25	N	N*	N*	N	-	N
26	N	N*	N*	N	-	N
34	N	N*	N*	N	-	N
35	N	N*	N*	N	-	N
38	N	N*	N*	N	-	N
40	N	N	-	N	-	N
44	N	N	-	N	-	N
46	N	N	-	N	-	N
47	N	N*	N*	N	-	N
49	N	N	-	N	-	N
52	N	N	-	N	-	N
53	N	N	-	N	-	N
56	N	N*	N*	N	-	+
57	N	N	-	N	-	N
TOTAL	15					1

Legenda: (+)=positivo; (N)=negativo; (N*)=negativo com amplificação inespecífica; (-)=não realizado

Na Tabela 6, estão os resultados dos testes moleculares e da reação LAMP-K26 das 28 amostras do grupo caso. Apenas uma amostra não apresentou resultado positivo na LAMP-K26.

Tabela 6: Resultados dos testes moleculares e reação LAMP-K26 nas amostras do grupo caso.

Metodologia	qPCR (kDNA)	PCR (<i>hsp70</i>)	PCR-RFLP (<i>hsp70</i>)	PCR (ITS-1)	PCR -RFLP (ITS-1)	LAMP
Amostras						
1sb	28.376,4	+	+	+	+	+
15sb	566,9	+	+	+	+	+
19sb	36,6	+	+	+	+	+
22sb	28.003,1	+	+	+	+	+
25sb	117,0	+	+	+	+	+
27sb	475,2	+	+	+	+	+
29sb	2.347,0	+	+	+	+	+
30sb	0,001	+	+	+	+	+
44sb	3.324,1	+	+	+	+	+
46sb	7.157,0	+	+	+	+	+
52sb	262,3	+	+	+	+	+
55sb	2.574,3	+	+	+	+	+
64sb	2.660,4	+	+	+	+	+
66sb	912,3	+	+	+	+	+
70sb	0,00003	+	+	+	+	+
71sb	1.455,1	+	+	+	+	+
74sb	539,3	+	+	+	+	+
77sb	5,1	+	+	+	+	N
81sb	0,0004	+	+	+	+	+
84sb	43,1	+	+	+	+	+
90sb	6.151,6	+	+	+	+	+
91sb	257,1	+	+	+	+	+
100sb	1.899,1	+	+	+	+	+
102sb	1.066,5	+	+	+	+	+
103sb	4.721, 3	+	+	+	+	+
105sb	0,0002	+	+	+	+	+
125sb	0,03	+	+	+	+	+
126sb	11.634	+	+	+	+	+
TOTAL	28					1

Legenda: (+)=positivo; (N)=negativo; (N*)=negativo com amplificação inespecífica; (-)=não realizado

Na validação da curva padrão da qPCR kDNA, foram obtidos os seguintes parâmetros (média de três curvas padrão): eficiência de 99,7%, coeficiente de correlação (R^2) de 0,99 e inclinação da curva de 3,33. A mediana da carga parasitária nas amostras de pele ($n = 28$) foi de 739,6 parasitos/ μg de DNA tecidual. Dentre essas 28 amostras, o LAMP-K26 apresentou resultado negativo apenas em uma delas, que apresentou carga parasitária menor (5,1 parasitos/ μg de DNA tecidual).

Os dados referentes à sensibilidade, especificidade e acurácia do teste LAMP-K26 estão na Tabela 7.

Tabela 7: Desempenho do teste LAMP-K26 no diagnóstico de LVC

Teste	Sensibilidade % [IC 95%] (n=28)	Especificidade % [IC 95%] (n=15)	Acurácia % [IC 95%] (n=43)
LAMP-K26	96,4 [81,7-99,9]	93,3 [68,1-99,8]	95,4 [84,2-99,4]

Os resultados da análise de concordância entre os testes moleculares nas 32 amostras não reagentes estão representados na Tabela 8. O maior grau de concordância do LAMP-K26 foi com o PCR kDNA (71,9 %), classificado como moderado ($k = 0,42$). Os testes moleculares apresentaram concordância leve a moderada, quando comparados entre si.

Tabela 8: Análise de concordância dos testes moleculares em amostras com resultados sorológicos não reagentes

Comparação de Métodos	Kappa (IC 95%)	Concordância
LAMP-K26 x PCR kDNA	0,42 (0,13 - 0,7)	Moderada
LAMP-K26 x PCR <i>hsp70</i>	0,18 (-0,13 - 0,48)	Leve
LAMP-K26 x PCR ITS-1	0,00 (-0,3 - 0,3)	Leve
PCR kDNA x PCR <i>hsp70</i>	0,07 (-0,07 - 0,2)	Leve
PCR kDNA x PCR ITS-1	0,56 (0,27 - 0,84)	Moderada
PCR <i>hsp70</i> x PCR ITS-1	0,10 (-0,09 - 0,29)	Leve

6 DISCUSSÃO

Dentre as medidas preconizadas pelos órgãos oficiais do Brasil para controle e prevenção da LV, a eliminação de reservatórios caninos é uma das indicações mais questionadas devido à sua baixa eficácia (Courtenay *et al.*, 2002; Dye, 1996), impactada por diversos fatores como a sensibilidade dos testes sorológicos utilizados, a taxa de reprodução da população canina e o período de latência até que o reservatório se torne infeccioso (Courtenay *et al.*, 2002; Travi *et al.*, 1998).

A utilização de metodologias diagnósticas para a LVC com alta sensibilidade e especificidade é necessária para que não ocorra eliminação errônea de animais, devido a resultados falso-positivos e, tampouco, a manutenção de cães com resultados falso-negativos, permanecendo esses animais como fonte de infecção para flebotomíneos e manutenção do ciclo da doença (Dantas-Torres, 2009; Silva, 1997).

Nossos resultados indicaram taxa de positividade do TR DPP® de 39,7% e do ELISA IDEXX, de 8,6%. Essa diferença de resultados pode ser explicada pela maior especificidade do ELISA IDEXX (Ribeiro *et al.*, 2019). Além disso, a ocorrência de reações cruzadas no TR DPP® com diversos outros patógenos de elevada prevalência no Brasil, como *T. cruzi* e outras espécies de *Leishmania*, pode explicar a diferença entre as taxas de positividade dos testes avaliados (Dantas-Torres, 2007; Ferreira *et al.*, 2007; Paz *et al.*, 2018; Solano-Gallego *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, a taxa de positividade do TR DPP® dos animais avaliados para possível composição do grupo não caso e, portanto, sem sinais clínicos de LVC, foi de 39,7%, resultado consideravelmente inferior à sensibilidade indicada na bula pelo fabricante (92,9 a 100%). Porém, o resultado da taxa de positividade desse trabalho foi similar ao relatado por GRIMALDI *et al.* (2012), que identificou diferença de sensibilidade no TR DPP®, em animais com sinais clínicos de LVC presentes (98%) e ausentes (47%).

A taxa de concordância entre as sorologias avaliadas no nosso estudo foi de 62,1%, sendo considerada leve. Nossos resultados concordam com os de SANTOS (2020), que analisou a concordância entre testes sorológicos e demonstrou que o TR DPP®, em conjunto com os ensaios imunoenzimáticos, possui leve concordância na análise de positividade.

Outro aspecto importante é a qualidade de vida e o bem-estar dos animais, pois exercem influência direta nos aspectos de sanidade e no processo saúde-doença (Düpjan e Dawkins, 2022). Os animais que participaram desse experimento vivem em boas condições, com alimentação adequada, número de indivíduos reduzido, recebem cuidados preventivos contra ectoparasitas, endoparasitas e LVC, atendimento veterinário regular e vacinação anual, fatores que podem interferir diretamente na prevalência de doenças nesses indivíduos.

Porém, é importante destacar que a realidade do abrigo envolvido neste estudo não é a observada na maioria dos abrigos brasileiros, os quais são mantidos em condições precárias, com número excessivo de animais, falta de verbas para alimentação e ausência de acompanhamento veterinário adequado. Conseqüentemente, tal situação propicia a disseminação de diversas doenças zoonóticas, inclusive a LVC.

Apesar das limitações dos testes sorológicos para o diagnóstico da LVC, nossos resultados demonstraram que o TR DPP® foi capaz de detectar de forma mais precoce amostras sororreagentes, uma vez que identificamos em nossos resultados uma alta taxa de soroconversão (55%) pelo ELISA IDEXX, após 90 dias da primeira coleta, em animais que inicialmente (D0) apresentavam resultado reagente apenas no TR DPP®.

Outro fator são as variações de títulos de anticorpos individuais, pois também influenciam nos resultados sorológicos. Devido ao amplo espectro clínico de doença na LVC, é possível observar diferentes tipos de resposta imune dos animais infectados, resultando em variações individuais de produção e manutenção de anticorpos (Morales-Yuste *et al.*, 2012). Além disso, em áreas endêmicas, a ocorrência de indivíduos expostos e que produzem baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, mas não estão infectados, deve ser considerado nos resultados sorológicos (Brasileish, 2018).

A PCR ainda continua como a principal técnica molecular utilizada para diagnóstico das leishmanioses, porém, o tempo relativamente alto para entrega de resultados, o custo da reação, a falta de padronização, a diversidade de alvos utilizados e a impossibilidade de uso a campo são fatores que limitam sua aplicação. Para composição do painel de amostras para avaliação da LAMP-K26, os animais selecionados para o grupo não caso foram avaliados através da PCR (kDNA) e PCR-

RFLP (*hsp70* e ITS-1) em fragmentos de pele. A taxa de positividade da PCR kDNA (46,9%) foi superior à encontrada para o alvo *hsp70* (3,1%). Esse resultado era esperado, uma vez que o componente de minicírculos representa 95% do kDNA da maioria das espécies de tripanossomatídeos (Shapiro e Englund, 1995).

Surpreendentemente, a taxa de positividade da PCR ITS-1 (37,5%) foi próxima à encontrada para o alvo kDNA (46,9%), apesar da diferença de sensibilidade desses alvos. Segundo Mahammadiha *et al.* (2013), a utilização do alvo kDNA na PCR convencional demonstra alta sensibilidade e especificidade, 88,9% e 94,6% respectivamente. E, para GARCIA *et al.* (2005), a amplificação do alvo ITS- 1, demonstrou sensibilidade de 72,2% e especificidade de 89,3%. De uma maneira geral, na avaliação da PCR convencional, utilizando diferentes alvos (kDNA, *hsp70* e ITS-1), nossos resultados indicaram concordância leve a moderada entre os testes.

Comparando nossos resultados de PCR convencional e PCR-RFLP utilizando os alvos *hsp70* e ITS-1, foi possível observar que, apesar de haver produtos amplificados na primeira técnica, eles não se comprovaram compatíveis com os padrões esperados para as espécies de *Leishmania* utilizadas como controle na segunda técnica. Para elucidação dessas amplificações inespecíficas identificadas, seria necessário o sequenciamento dos perfis encontrados.

Nesse estudo, a otimização da técnica de amplificação isotérmica mediada por Loop (LAMP) foi realizada utilizando como alvo a proteína K26 para detecção de *L. infantum*, em fragmentos de pele de cães. Os *primers* utilizados foram desenhados por AVELAR *et al.* (2019) para estudo de diagnóstico de leishmaniose humana no Brasil, sendo específicos para o complexo *L. donovani*.

Nossos resultados demonstraram que a LAMP-K26 foi capaz de detectar 100fg de DNA de *L. infantum* após 30 minutos de reação, 10fg após 35 minutos e 1fg após 40 minutos. Esses resultados são similares aos de Takagi *et al.* (2009), Gao *et al.* (2015), Avelar *et al.* (2019) e Verma *et al.* (2017), que relataram o limite de detecção de 1fg de DNA de *Leishmania* na reação LAMP.

Na avaliação da especificidade analítica, a LAMP-K26 foi capaz de identificar a amostra contendo DNA de *L. infantum* após 30 minutos de reação, permanecendo as demais amostras controle (DNA de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*) negativas. Porém, após 35 minutos de reação, houve mudança de coloração da amostra com DNA de *L. braziliensis* (rosa para amarelo). Esse resultado pode ser

explicado pelo maior tempo de reação, possibilitando maior risco de hidridização, formação de dímeros de *primers* e, conseqüentemente, gerando resultados falso-positivos (Wong *et al.*, 2018).

Dentre as 28 amostras do grupo caso, a LAMP-K26 foi capaz de detectar amostras com diferentes cargas parasitárias, que variaram de 0,0001 a 28.376,7 parasitos/ μ g de DNA tecidual. Entretanto, a amostra 77sb apresentou resultado negativo na LAMP-K26. Dentre as 15 amostras do grupo não caso, a LAMP-K26 apresentou resultado positivo na amostra 56, que apresentou amplificação inespecífica na PCR (*hsp70*) e PCR- RFLP (*hsp70*). Para auxiliar na elucidação desse resultado seria indicado o sequenciamento do produto de PCR da amostra.

Nosso estudo é o primeiro a utilizar a LAMP-K26 e os *primers* desenvolvidos por AVELAR *et al.* (2019) para o diagnóstico de LVC. Nossos resultados indicaram 96,4% de sensibilidade, 93,3% de especificidade e 95,4% de acurácia, indo ao encontro do observado no estudo de Avelar *et al.* (2019) que demonstrou 98,2% de sensibilidade, 98,1% de especificidade e acurácia de 98,2% da LAMP-K26.

Na literatura, estudos que utilizaram a LAMP para diagnóstico de LVC ainda são escassos. Chaouch *et al.* (2013) utilizaram um conjunto de seis *primers* direcionados ao gene de múltiplas cópias da cisteína protease B de *L. infantum* em amostras de sangue canino e obtiveram 54% de sensibilidade e 80% de especificidade na LAMP. O tipo de amostra do estudo pode explicar a diferença de sensibilidade em comparação com nossos resultados, uma vez que o sangue não é considerado uma amostra sensível para a LVC.

GAO *et al.* (2015) utilizaram amostras de *swab* conjuntival para avaliar um ensaio LAMP, com *primers* projetados para amplificar as sequências de minicírculos de DNA do cinetoplasto de isolado de *L. infantum*. O estudo comparou a taxa de positividade da LAMP (61,3%) com outras metodologias: PCR (58,6%), ELISA (40,5%) e microscopia direta (10,8%).

A escolha da pele como amostra para a reação deve-se ao fato de que, apesar de a LVC ser uma doença sistêmica e a presença do parasito em uma ampla variedade de tecidos ser comum (Marcelino *et al.*, 2020), a detecção do parasito na pele de animais infectados, ou em tratamento, permite informações valiosas sobre o risco de infecção de flebotomíneos e conseqüente disseminação da doença para humanos (Quaresma *et al.*, 2009).

Esse é o primeiro estudo de avaliação da técnica LAMP com o alvo gênico-K26 para o diagnóstico da LVC. Os resultados demonstraram uma excelente performance para detecção molecular de DNA de *L. infantum* em pele de cães, abrindo perspectivas para novos estudos com maior número amostral, diferentes tipos de amostras e, preferencialmente, prospectivos.

7 CONCLUSÃO

O ensaio LAMP-K26, avaliado neste estudo, para detecção de DNA de *L. infantum* em amostras de fragmento de pele de cães naturalmente infectados, apresentou resultados analíticos e de desempenho clínico (sensibilidade, especificidade e acurácia) satisfatórios nas amostras avaliadas, reforçando a possibilidade de ampliação do uso dessa metodologia como ferramenta diagnóstica da LVC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBUQUERQUE, A. *et al.* Evaluation of four molecular methods to detect *Leishmania* infection in dogs. **Parasites Vectors**, v.10, n. 1, 57. doi: 10.1186/s13071-017-2002-2.

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**. v.7, p. 1-12, 2012.

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v.20, n.1, pp.259-265, 2004.

ALVES, A.S. *et al.* Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Research in Veterinary Science**, n. 93, 1329–1333, 2012.

ARRUDA M.M. *et al.* Validity and reliability of enzyme immunoassays using *Leishmania major* or *L. infantum* antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **PLoS One**, v. 8, e69988, 2013.

ASHFORD, R.W. A new morphological character to distinguish *Sergentomyia* and *Phlebotomus*. **Parasitologia**, v. 33, Supp, p. 79-83, 1991.

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoir and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p. 523-532, 1996.

AVELAR, D.M.; CARVALHO, D.M.; RABELLO, A. Development and Clinical Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Biomed Research International**, v. 1, p. 1-7, 2019.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. **The Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 14–15, 2008.

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.

BENCHIMOL, J.L. *et al.* Leishmanioses: sua configuração histórica no Brasil com ênfase na doença visceral nos anos 1930 a 1960. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 14, n. 2, 2019. doi.org/10.1590/1981.81222019000200017

BENCHIMOL, J.L.; JUNIOR, D.G.J. **Uma história das leishmanioses no novo mundo**. 1ª ed. Belo Horizonte: Editora Fino Traço; Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2020.

BEVILACQUA, P. D. *et al.* Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, n. 1, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1ª ed. Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 – MAPA/MS**. Brasília, 2016.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota Técnica nº 5/2021-CGZV/DEIDT/SVS/MS**. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica da Leishmaniose Visceral. Brasília, 2021.

BRASILEISH. Grupo de Estudo em Leishmaniose Animal. **Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da Leishmaniose Canina**. 2018.

BRUCES, A. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 5ª edição. ArtMed, p. 545, 2011.

BURNS, J.M. *et al.* Molecular characterization of a Kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, p. 775-779, 1993.

CARVALHO, M.R. *et al.* Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Trop.**, v. 116, p. 108–110, 2010.

CARVALHO, A.G.; LUZ, J.G.G.; RODRIGUES, L.D. Factors associated with *Leishmania* spp. infection in domestic dogs from an emerging area of high endemicity for visceral leishmaniasis in Central-Western Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 125, p. 205-211, 2018.

CHAOUCH, M. *et al.* Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Leishmania infantum* in canine leishmaniasis based on cysteine protease B genes. **Vet Parasitol.**, v. 198, n. 1-2, p. 78-84, 2013.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992.

COURTENAY, O. *et al.* Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314–1320, 2002. doi.org/10.1086/344312

COURTENAY, O. *et al.* Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 8. N. 1, e2583, 2014.

COUTINHO, S.G. *et al.* A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil): where the human diseases occur. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 17–22, 1985.

DA SILVA, L.A. *et al.* Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the *hsp70* gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. **Infect Genet Evol.**, v. 10, n. 1, p. 77-83, 2010.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Vet. Parasitol.**, v. 149, p. 139-46, 2007.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniasis in South America. **Parasite & Vector**, v.2, Supp.1, S1, p.1-8, 2009.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health. **Emerg Infect Dis.**, v. 25, n. 12, p. 1-4, 2019.

DEGRAVE, W. *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* using the polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 367–368, 1994.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DUARTE G.R. *et al.* Dynamic solid phase DNA extraction and PCR amplification in polyester-toner based microchip. **Anal Chem.**, v. 83, n. 13, p. 5182-5189, 2011.

DÜPJAN S., DAWKINS, M.S. Animal Welfare and Resistance to Disease: Interaction of Affective States and the Immune System. **Front Vet Sci.**, v. 9, 929805, 2022.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 55, n. 125–130, 1996.

EL TAIL, N.O. *et al.* Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 575–579, 2000.

FRAGA, J. *et al.* Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 genes. **Infect. Genet. Evol.**, v. 10, p. 238-245, 2010.

FERREIRA, E.C. *et al.* Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 235–241, 2007.

FERRO, C.; PARDO R.; TORRES M.; MORRISON A.C. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **J MedEntomol.**, v. 34, p. 719-728, 1997.

FIGUEIREDO, F.B. *et al.* Validation of the Dual-Path Platformchromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, e180260, 2018.

FLINN, H.M.; SMITH D.F. Genomic organisation and expression of a differentially regulated gene family from *Leishmania major*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p.755–762, 1992.

GALATI, E.A.B. *et al.* Estudo de Flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, p. 378-390, 1997.

GALDIOLI, R.; ROCHA, Y.S.G.; GARCIA, R.C.M. Perfil dos abrigos de cães e gatos brasileiros quanto às políticas públicas externas e internas. **Research, Society and Development**, v.11, n. 9, e48111932253, 2022.

GALLEGO, M. Emerging parasitic zoonoses: leishmaniosis. **Revue Scientifique et Technique**, v. 23, n. 2, p. 661-676, 2004.

GARCIA, L. *et al.* Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2294–2297, 2004.

GARCIA, A.L. *et al.* American Tegumentary Leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 5, p. 109-116, 2005.

GARCÍA-CASTRO, A. *et al.* Humoral and Cellular Immune Response in Asymptomatic Dogs with Visceral Leishmaniasis: A Review. **Vaccines**, v. 10, 947, 2022.

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

GHASEMIAN, M. *et al.* Development and Assessment of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis in Iran. **Iran J Parasitol.**, v. 9, n. 1, p. 50-59, 2014.

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

GONÇALVES, A.A.M. *et al.* An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 9, 427, 2019.

GRIMALDI, G.J.R. *et al.* Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on dual-path platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 106, p. 54–59, 2012.

HARRIS, E. *et al.* Single-step Multiplex PCR Assay para caracterização de complexos New World *Leishmania*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 1989-1995, 1998.

HERRADA, C.A. *et al.* Advances in Diagnostic Methods for Zika Virus Infection. **J Med Device**, v. 12, n. 4, 0408021-4080211, 2018. doi: 10.1115/1.4041086.

HOFMAN, V. *et al.* Immunostaining of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* using monoclonal antibody (10–11) to the *Leishmania* homologue of receptors for activated C-kinase. **American Journal of Clinical Pathology**, v., 120, p. 567–574, 2003.

HONG, A. *et al.* One Health Approach to Leishmaniasis: Understanding the Disease Dynamics through Diagnostic Tools. **Pathogens**, v. 9, n. 10, 809, 2020.

IMANI, M. *et al.* Molecular technique for detection of *Leishmania infantum* isolates in Iran. **Trop Parasitol.**, v. 4, n. 1, p. 35–7, 2014.

IDEXX. **Bula kit Snap Leishmania**. Disponível em: <https://www.idexx.com> - Acesso em: 01/03/2023.

INMET. Disponível em <https://portal.inmet.gov.br/> - Acesso em: 01/03/2023.

IBGE. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/> - Acesso em: 01/03/2023.

IPB. 2022. Disponível em <http://institutopetbrasil.com/fique-por-dentro/numero-de-animais-de-estimacao-em-situacao-de-vulnerabilidade-mais-do-que-dobra-em-dois-anos-aponta-pesquisa-do-ipb/> - Acesso em: 01/03/2023.

JARA, M. *et al.* Real-time PCR assays for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. **J Clin Microbiol.**, v. 51, n. 6, p. 1826-1833, 2013.

KAMHAWI, S. *et al.* Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**, v. 290, n. 5495, p. 1351-1354, 2000.

KILLICK-KENDRICK, R.; LEANEY, A.J.; READY, P.D. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **J. Med. Entomol.**, v. 13, p. 429-440, 1977.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clin Dermatol.**, v. 17, p. 279-289, 1999.

KHAN, M.G. *et al.* Short communication: evaluation of a new rapid diagnostic test for quality assurance by kala azar elimination programme in Bangladesh. **J Parasitol Res.** 2011, 862475, 2011.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAINSON R.; SHAW, J.J. New World leishmaniasis – the Neotropical *Leishmania* species. In: Cox FE, Kreier JP, Wakelin D, editors. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th ed. London: HodderHeadline Group; p. 241-66, 1998.

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

LAURENTI, M.D. *et al.* Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (infantum) chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 77, n. 1, p. 15-24, 1996.

LUKES, J. *et al.* Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Mol Biochem Parasitol**, v. 195, n. 2, p. 115-122, 2014.

LUKEŠ, J. *et al.* Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. **Eukaryot Cell**, v. 1, p. 495–502, 2002.

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

MARCELINO, A.P. *et al.* Comparative PCR-based diagnosis for the detection of *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Acta Trop.**, v. 207, 105495, 2020.

MARCONDES, M. *et al.* Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 15–19, 2011.

MARZOCHI, M.C.A. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.80, p.349-357, 1985.

MEIDE, W.F.V.D. *et al.* Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5560–5566, 2005.

MENDES, G. M. **Testes Moleculares Baseados em Amplificação Isotérmica Mediada por Loop para detecção de Arbovírus em Microdispositivos Descartáveis**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, Programa de Pós-graduação em Química, Goiânia, 2020.

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

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

MIRANDA, S. *et al.* Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniasis diseased dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 85, p. 35–38, 2008.

MOHAMMADIHA, A. *et al.* Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. **Exp Parasitol**, v. 133, n. 1, p. 89-94, 2012.

MOHAPATRA, T.M. *et al.* Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 4, p. 114-117, 2010.

MORALES-YUSTE, M. *et al.* Epidemiological Implications of the Use of Various Methods for the Diagnosis of Canine Leishmaniasis in Dogs with Different Characteristics and in Differing Prevalence Scenarios. **Parasitol. Res**, v. 111, p. 155–164, 2012.

MORALES-YUSTE, M.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; CORPAS-LOPEZ, V. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Vet Sci**, v. 9, n. 8, 387, 2022.

MULLIS, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 51, Pt 1, p. 263-273, 1986.

NASEREDDIN, A. *et al.* Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. **Journal of Parasitology**, v. 92, p. 178–183, 2006.

NEVES, D.P. *et al.* **Parasitologia Humana**. Biblioteca Biomédica. 2007.

NOTOMI, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Res.**, V. 28, n. 12, E63, 2000.

NZELU, C.O.; KATO, H.; PETERS, N.C. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of *Leishmania* infection. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 13, n. 11, e0007698, 2019.

OLIVA, G. *et al.* Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of Clinical Microbiology**. 44,1318–1322, 2006.

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

OLIVEIRA, E.F. *et al.* Behavioral aspects of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in urban area endemic for visceral leishmaniasis. **J Med Entomol.**, v. 50, p. 277-284, 2013.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. World Health Organization. Geneva, 2010.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030**. Geneva, 2020.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Leishmaniasis**. Disponível em <https://www.who.int/leishmaniasis/en/> (accessed on 13/Mar/2023).

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas**. OPAS, 2019.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas**. Segunda edição. Washington, DC. OPAS; 2022.

PALTRINIERI, S. *et al.* Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Vet Clin Pathol.**, v. 45, n. 4, p. 552-578, 2016.

PARIDA, M. *et al.* Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Reviews in Medical Virology. Chichester**, v. 18, n. 6, p.407-421, 2008.

PAZ, G.F. *et al.* Implications of the use of serological and molecular methods to detect infection by *Leishmania* spp. in urban pet dogs. **Acta Trop**, v. 182, p. 198-201, 2018.

PEDRAS, M.J. *et al.* Comparative evaluation of direct agglutination test, rk39 and soluble antigen-ELISA and RIFI for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 172-178, 2008.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **O Brazil-Médico**, v. 46, p. 949-952, 1934.

PINELLI, E. *et al.* Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect Immun.**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PITA-PEREIRA, D. *et al.* Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinni* (Diptera: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Trop.**, v. 107, p.66-9, 2008.

QUARESMA, P.F. *et al.* Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Trop.**, v. 111, n. 3, p. 289-294, 2009.

QUEIROZ, N.M. *et al.* Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Rev Bras Parasitol Vet.**, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010.

QUEIROZ-JR, E.M. **Validação Do Teste Imunocromatográfico Rápido Dual Path Platform Para O Diagnóstico Da Leishmaniose Visceral Canina.** 2011. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2011.

RAYMOND, F. *et al.* Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 3, p. 1131–1147, 2012.

READY, P.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Epidemiology**, n. 6, p. 147–154, 2014.

REGUERA, R.M. *et al.* Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Vet Parasitol.**, v. 227, p. 98–114, 2016.

REITHINGER, R. *et al.* Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002.

RIBEIRO, V.M. *et al.* A Study Group about Animal Leishmaniasis. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. **Parasit Vectors.**, v. 6, n. 1, p. 8, 2013.

RIBEIRO, V.M. *et al.* Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs. **Vet Parasitol.**, v. 274, 108920, 2019.

ROCHA, M. F. *et al.* Dogs with divergent serology for visceral leishmaniasis as sources of *Leishmania* infection for *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies – an observational study in an endemic area in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 14, n. 2, 2020.

ROMERO, G.A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America-a systematic review. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 4, n. 1, e584, 2010.

ROQUE, A.L.R. **Avaliação do Potencial de Pequenos Mamíferos e Importância de Animais Domésticos na Manutenção dos Ciclos de Transmissão de Tripanosomatídeos: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*.** Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 2009.

ROQUE, A.L.; JANSEN, A.M.; Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **Int J Parasitol Parasites Wildl**, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.

ROSALES-CHILAMA, M. *et al.* Parasitological Confirmation and Analysis of *Leishmania* Diversity in Asymptomatic and Subclinical Infection following Resolution of Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 9, n. 12, e0004273, 2015.

ROTUREAU, B. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 1, p. 81-96, 2006.

RUIZ-POSTIGO, J.A.; LISE, G.; SAURABH, J. **Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators.** Weekly epidemiological record WHO. Junho, 2020.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol.**, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.

SÁDLOVÁ, J. *et al.* The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. **Cell Microbiol.**, v. 12, n. 12, p. 1765-1779, 2010.

SANTOS, C.S. *et al.* Representações sociais de profissionais de saúde sobre doenças negligenciadas. **Esc. Anna Nery**, v. 21, n. 1, 2017.

SANTOS, E.F.M. **Bionomia de *Migonemyia migonei* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) em condições experimentais.** Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto Leônidas e Maria Deane. Fundação Oswaldo Cruz. Manaus, 2019.

SANTOS, M.C.S. **Avaliação de testes sorológicos de importância diagnóstica na Leishmaniose Visceral Canina.** 2020. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Biotecnologia) - Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2020.

SARIDOMICHELAKIS, M.N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. **Vet Dermatol.**, v. 20, n. 5-6, p. 471-489, 2009.

SAVANI, E.S.M.M. *et al.* Natural infection in sand fly vectors of cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Mato Grosso do Sul state, Brazil. Proceedings of the V International Symposium on Phlebotomine sandflies. **Archives de l' Institute Pasteur de Tunis**, v. 82, p. 4849, 2005.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R.L.; MESSER, G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, n. 20, 9944-9948, 1992.

SECUNDINO, N.F *et al.* *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. **J. Med. Entomol.**, v. 42. N. 6, p. 928-938, 2005.

SEVILHA-SANTOS, L. *et al.* Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, p. 242-247, 2019.

SHAPIRO, T.A.; ENGLUND, P.T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 117-143, 1995.

SILVA, J.C.F. **Leishmaniose visceral canina no Município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.** [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; 1997.

SILVA, E. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, pp. 285-291, 2001.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annual Review of Microbiology**, V. 41, p. 363–382, 1987.

SRIWORARAT, C. *et al.* Development of *loop*-mediated isothermal amplification (LAMP) for simple detection of *Leishmania* infection. **Parasit Vectors**, v. 8, 591, 2015.

SHAW, J. The leishmaniasis--survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J Clin Microbiol.**, v. 39, n. 2, p. 560-563, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.

SOUTTER, F. *et al.* An investigation of polymorphisms in innate and adaptive immune response genes in canine leishmaniasis. **Vet Parasitol.**, v. 269, p. 34-41, 2019.

SOUSA-GOMES, M.L. *et al.* Coinfecção *Leishmania*-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 20, n. 4, p. 519-526, 2011.

TALMI-FRANK, D. *et al.* Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt analysis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 4, n. 1, e581, 2010.

TAKAGI, H. *et al.* Sensitive, specific, and rapid detection of *Leishmania donovani* DNA by *loop*-mediated isothermal amplification. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 81, n. 4, p. 578-82, 2009.

TEIXEIRA, D.E. *et al.* Atlas didático: **Ciclo de vida da *Leishmania***. Fundação CECIERJ/Consórcio CEDERJ, 2013.

TOMITA, N. *et al.* *Loop*-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature Protocols**, 877–882, 2008.

TRAVI, B.L. *et al.* *Leishmania (Leishmania) chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. **Exp Parasitol.**, v. 88, p. 73–75, 1998.

TRAVI, B.L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 12, n. 1, e0006082, 2018.

TSOKANA, C.N. *et al.* **Molecular diagnosis of leishmaniasis, species identification and phylogenetic analysis.** In: CLABORN, D. *Leishmaniasis: Trends in epidemiology, diagnosis and treatment.* Intech Open, 161-193, 2014.

VERMA, S. *et al.* Development of a rapid *loop*-mediated isothermal amplification assay for diagnosis and assessment of cure of *Leishmania* infection. **BMC Infect Dis.**, v. 17, n. 1, 223, 2017.

WONG, Y.P. *et al.* *Loop*-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 3, p. 626-643, 2018.

WERNECK, G.L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Rev Saúde Pública**, v. 48, p. 851-856, 2014.