

**Ministério da Saúde**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Instituto René Rachou**

**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA EM CÃES, NATURALMENTE  
INFECTADOS POR *Leishmania infantum*, PARA O APRIMORAMENTO DO  
DIAGNÓSTICO MOLECULAR E MONITORAMENTO DA INFECÇÃO**

por

Úrsula Maira Russo Chagas

Belo Horizonte

2019

**DISSERTAÇÃO MCS-IRR**

**U.M.R.CHAGAS**

**2019**

**ÚRSULA MAIRA RUSSO CHAGAS**

**AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA EM CÃES, NATURALMENTE  
INFECTADOS POR *Leishmania infantum*, PARA O APRIMORAMENTO DO  
DIAGNÓSTICO MOLECULAR E MONITORAMENTO DA INFECÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração Doenças Infecto-Parasitárias e crônicas não transmissíveis.

Orientação: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo

Coorientação: Dr. Gustavo Fontes Paz

Belo Horizonte

2019

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB/6 1975

C433a Chagas, Úrsula Maira Russo.  
2019

Avaliação da carga parasitária em cães, naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, para o aprimoramento do diagnóstico molecular e monitoramento da infecção/  
Úrsula Maira Russo Chagas – Belo Horizonte, 2019.

XIV, 61 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 50-60

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em 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 Visceral/virologia 2. qPCR 3. Status clínico I. Título. II. Gontijo, Célia Maria Ferreira (Orientação). III. Paz, Gustavo Fontes (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

**ÚRSULA MAIRA RUSSO CHAGAS**

**AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA EM CÃES, NATURALMENTE  
INFECTADOS POR *Leishmania infantum*, PARA O APRIMORAMENTO DO  
DIAGNÓSTICO MOLECULAR E MONITORAMENTO DA INFECÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração Doenças Infecto-Parasitárias e crônicas não transmissíveis.

**Banca Examinadora:**

Prof. Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo (IRR – FIOCRUZ MINAS) Titular

Prof. Dr. Edward José de Oliveira (IRR – FIOCRUZ MINAS) Titular

Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri (UFMG) Titular

Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares (IRR – FIOCRUZ MINAS) Suplente

**Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 27/02/2019**

Dedico este trabalho a minha família.

Obrigada por todo apoio, incentivo e inspiração.

“Chegará o dia que o homem conhecerá o íntimo de um animal  
e nesse dia todo o crime contra um animal  
será um crime contra a humanidade.”

Leonardo da Vinci

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha orientadora, Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo, pela disponibilidade, atenção, ensinamentos e por ser um exemplo de dedicação à pesquisa e ao ensino.

Também agradeço ao meu coorientador, Dr. Gustavo Fontes Paz, por toda ajuda na execução deste projeto e valiosas sugestões para o seu aprimoramento, ao Dr. Daniel Moreira de Avelar, pela paciência e confiança durante a execução do trabalho e no meu ilimitado processo de aprendizagem, bem como, a Dra. Andreza Pain Marcelino, por me ceder os tecidos, DNA e todo histórico clínico dos cães utilizados no desenvolvimento deste estudo.

Enfim, agradeço a todos os pesquisadores, técnicos e estudantes do Grupo de Estudos em Leishmanioses por estes dois anos que compartilhamos conhecimentos, informações e companheirismo e a todas as pessoas que trabalham no Instituto René Rachou e que tive a oportunidade de conhecer durante o período de estudo na pós-graduação.

Muito obrigado!

## RESUMO

Com o avanço da biologia molecular, como ferramenta no diagnóstico de cães infectados por *L. infantum*, a qPCR vem sendo utilizada para a quantificação da carga parasitária em diferentes tecidos de cães, com ou sem manifestações clínicas, podendo ser empregada no diagnóstico, monitoramento da infecção durante o tratamento e em estudos clínicos de validação de vacinas. Com o objetivo de aprimorar o diagnóstico molecular e o consequente monitoramento da infecção, o presente estudo avaliou a carga parasitária em vários tecidos de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* apresentando diferentes status clínicos. Para isso, foi realizada a qPCR em amostras de pele, swab conjutival e punções de linfonodo poplíteo e medula óssea de 65 cães naturalmente infectados por *L. infantum* e provenientes do Centro de Controle de Zoonose de Betim/MG. Os cães foram divididos em três grupos de acordo com o escore clínico: grupo 1 (n=12) composto por animais com zero pontos e sem manifestações clínicas da doença, grupo 2 (n=35) composto por animais com escore variando de 1 a 5 pontos e com manifestações clínicas moderadas e grupo 3 (n=18) de cães com escore variando de 6 a 11 pontos e manifestações clínicas intensas. Outra análise foi realizada classificando os animais em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos da doença. As qPCRs realizadas nas amostras dos 65 cães indicaram que a pele foi o tecido com maior carga parasitária, seguido das amostras de punções de linfonodo poplíteo e medula óssea, sendo as amostras de swab conjutival as que apresentaram as menores cargas. Além disso, a pele também foi o tecido com maior carga parasitária ao se avaliar os grupos individualmente. Os animais do grupo 3, com manifestações clínicas intensas, apresentaram maior carga parasitária nos diferentes tecidos quando comparados aos animais dos grupos 2 e 3. Por fim, os animais com manifestações clínicas da doença, apresentaram maior carga parasitária quando comparados aos cães sem manifestações. O fato de a pele ser o principal local de acesso do vetor ao parasito e neste estudo foi o tecido que apresentou a maior quantidade de parasitos/ $\mu$ L em todas as análises, reforça a importância do cão como reservatório de *L. infantum* na natureza. Além disso, foi observada uma correlação forte e positiva entre a intensidade das manifestações clínicas com o aumento da carga de parasitos na pele. Em conclusão, a pele é o tecido de eleição para o diagnóstico molecular da infecção por *L. infantum* nas diferentes situações clínicas dos animais.

**Palavras-Chave:** Leishmaniose Visceral Canina, qPCR, status clínico.



## ABSTRACT

The development of molecular biology methodologies as tools in the diagnosis of dogs infected with *Leishmania infantum*, qPCR has been used to quantify the parasite load in different dog tissues, with or without clinical manifestations, and can be used in the diagnosis, during treatment and in clinical trials of vaccine validation. In order to improve the molecular diagnosis and the consequent infection monitoring, the present study evaluated the parasite load in several tissues of dogs naturally infected with *L. infantum* presenting different clinical status. For this, qPCR was performed on skin samples, conjunctival swabs and popliteal lymph nodes and bone marrow from 65 dogs naturally infected by *L. infantum* from the Zoonosis Control Center of Betim / MG. The dogs were divided into three groups according to the clinical score: group 1 (n = 12) composed of animals with zero points and no clinical manifestations of the disease, group 2 (n = 35) composed of animals with a score ranging from 1 to 5 points with moderate clinical manifestations and group 3 (n = 18) of dogs with scores varying from 6 to 11 points and intense clinical manifestations. Another analysis was performed by classifying the animals into two groups according to the presence or absence of clinical signs of the disease. The qPCRs performed on the samples of the 65 dogs indicated that the skin was the tissue with the highest parasitic load, followed by samples of popliteal lymph node and bone marrow, with the conjunctival swab having the lowest loads. In addition, the skin was also the tissue with the highest parasitic load when evaluating the groups individually. The animals of group 3, with intense clinical manifestations, presented higher parasitic load in the different tissues when compared to the animals of groups 2 and 3. Finally, the animals with clinical manifestations of the disease presented higher parasitic load when compared to dogs without clinical manifestations. The fact that the skin is the main access point of the vector to the parasite and in this study was the tissue that presented the highest number of parasites in all the analyzes, reinforces the importance of the dog as reservoir of *L. Infantum* in nature. In addition, a strong and positive correlation was observed between the intensity of the clinical manifestations and the increase in parasite load on the skin. In conclusion, the skin is the tissue of choice for the molecular diagnosis of *L. infantum* infection in the different animal clinical situations.

**Keywords:** Visceral Canine Leishmaniasis, qPCR, clinical status.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Correlação entre a carga parasitária dos tecidos e o escore clínico dos cães.....	43
Figura 2 - Carga Parasitária nos cenários analisados.....	45

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Carga parasitária obtida nas amostras de DNA provenientes de diferentes tecidos dos cães infectados por <i>Leishmania infantum</i> .....	35
Gráfico 2 - Comparação da carga parasitária entre os tecidos do grupo 1.....	37
Gráfico 3 - Comparação da carga parasitária entre os tecidos do grupo 2.....	39
Gráfico 4 - Comparação da carga parasitária entre os tecidos do grupo 3.....	41
Gráfico 5 - Comparação da carga parasitária entre os grupos por tecido.....	42
Gráfico 6 - Comparação da carga parasitária entre os grupos por tecido.....	44

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Pontuação atribuída para categorias variáveis associadas com a LVC obtidas de exame clínico dos animais investigados.....	32
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores da variação da carga, média, desvio padrão e mediana dos 65 cães.....	34
Tabela 2 - Valores de p no teste de Mann-Whitney.....	35
Tabela 3 - Valores da variação da carga, média, desvio padrão e mediana do grupo 1.....	36
Tabela 4 - Valores de p no teste de Mann-Whitney.....	37
Tabela 5 - Valores da variação da carga, média, desvio padrão e mediana do grupo 2.....	38
Tabela 6 - Valores de p no teste de Mann-Whitney.....	39
Tabela 7 - Valores da variação da carga, média, desvio padrão e mediana do grupo 3.....	40
Tabela 8 - Valores de p no teste de Mann-Whitney.....	41
Tabela 9 - Valores das medianas dos cães sem e com manifestações clínicas.....	44
Tabela 10 - Resultado da PCR convencional e da qPCR dos 65 cães.....	63

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

HSP 70 – Heat Shock Protein 70

IFI – Imunofluorescência Indireta

IFN-  $\gamma$  – Interferon Gama

IgG/IgM/IgE/IgA – Imunoglobulina G/M/E/A

IL-2 – Interleucina do Tipo 2

IL-10 – Interleucina 10

kDNA – Ácido Desoxirribonucléico do Cinetoplasto

LV – Leishmaniose Visceral

LC – Leishmaniose Cutânea

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MS – Ministério da Saúde

NNN – Novy-MacNeal-Nicolle

PAHO – Pan America Health Organization

PB – Pares de Base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR – PCR quantitativa

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

TNF- $\alpha$  – Tumor Necrosis Factor

TH 1 – T Helper 1 Cells

TH 2 – T Helper 2 Cells

TR DPP – Teste Rápido Dual Path Platform

TRL-2 – Toll-Like Receptor 2

WHO – World Health Organization

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Leishmaniose visceral.....	18
1.2 Leishmaniose visceral canina.....	21
<i>Histórico.....</i>	21
<i>Etiopatogenia, manifestações clínicas e susceptibilidade de cães à infecção por L. infantum.....</i>	22
<i>Principais métodos de diagnóstico da infecção por Leishmania spp.....</i>	23
<i>Importância do estudo da carga parasitária no monitoramento do tratamento de cães infectados por L. infantum.....</i>	28
2. JUSTIFICATIVA.....	29
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Geral.....	30
3.2 Específicos.....	30
4. METODOLOGIA.....	31
<i>Aspectos éticos.....</i>	31
<i>Amostras biológicas.....</i>	31
<i>Quantificação da carga parasitária das amostras por qPCR.....</i>	32
<i>Análises estatísticas.....</i>	33
5. RESULTADOS.....	34
<i>Cenário 1: Avaliação da carga parasitária nos diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por Leishmania infantum.....</i>	34
<i>Cenário 2: Avaliação da carga parasitária de cães por escore clínico.....</i>	36



<i>Cenário 3: Avaliação da carga parasitária de cães sem e com manifestações clínicas</i> .....	43
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXOS.....	63

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma das enfermidades parasitárias mais negligenciadas no mundo, que afeta indivíduos com baixo poder socioeconômico, principalmente, nos países em desenvolvimento (Alvar, 2006).

Em 2017, foi reportado pela World Health Organization (WHO) 200 países e territórios contendo casos de leishmanioses, sendo que destes, 10 são endêmicos somente para LV (WHO, 2019). Já nas Américas, a LV encontra-se distribuída em 12 países, com 96% dos casos sendo reportados no Brasil, com aproximadamente, 4.200 a 6.300 casos por ano (PAHO, 2017).

No Brasil, a área rural era a mais afetada pela doença, onde 95% dos casos eram relatados entre os habitantes da zona rural ou de pequenos vilarejos (Deane & Deane, 1957). A partir da década de 80, a LV passou a ter uma maior distribuição nos centros urbanos (MS, 2006). Entre os anos de 1980 a 2005, foram reportados no país, 59.129 casos de LV, sendo que 82,5% destes encontravam-se na região Nordeste do Brasil (Maia-Elkhoury et al., 2008). Em estudo realizado por Bezerra et. al (2018), pode-se observar que no ano de 2016 os maiores valores de mortalidade decorrente de LV ocorreram em estados do Nordeste e Sudeste, como consequência do processo de urbanização da doença. Além disso, observou-se um aumento dos casos de LV ao longo dos anos.

Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral pertencem ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*. Na Índia, Paquistão, China Oriental, Bangladesh, Nepal, Sudão e Quênia a doença é causada pela espécie *Leishmania donovani* (Laveran & Mesnil, 1903). Nestas regiões, o homem atua como reservatório do parasito e a doença apresenta um perfil antroponótico (Tavares et al., 2003).

No Velho Mundo, a espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908) é o agente etiológico da LV zoonótica presente nas regiões sudoeste e central da Ásia, nordeste da China, norte da África e Europa Mediterrânea. No Novo Mundo, a espécie *L. infantum* (sin: *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937) é o agente da LV, que também apresenta um caráter zoonótico (Dantas-Torres, 2006).

No Brasil a *Leishmania (Leishmania) infantum* é transmitida aos hospedeiros vertebrados pela picada de fêmeas de flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*. A hematofagia é realizada

somente pelas fêmeas, que podem alimentar-se em um grande número de vertebrados, entre: mamíferos, répteis e pássaros (Tesh et al., 1972; Morrison et al., 1993). Os flebotomíneos estão frequentemente associados com florestas, entretanto, também podem ser encontrados em áreas sem cobertura vegetal como centros urbanos e cavernas (Galati et al.; 2010).

A espécie vetora de maior importância no Brasil, *Lutzomyia longipalpis*, foi descrita pela primeira vez por Lutz e Neiva em 1912, mas, foi Evandro Chagas em 1936, quem associou casos de LV observados em pacientes residentes do estado de Sergipe, com flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, encontrados ao redor de suas casas (Lainson & Rangel, 2005).

Entre os principais potenciais reservatórios silvestres e sinantrópicos de *Leishmania infantum* nas Américas foram apontadas várias espécies de mamíferos tais como: *Didelphis marsupialis* e, *D. albiventris* (marsupiais), o roedor *Thrichomys laurentius*, *Cerdocyrum thous* e *Speothos venaticus* (carnívoros) e *Carollia perspicillata* (quiróptero). Estes animais têm importância na manutenção da circulação do parasito nos ambientes silvestres, sendo que algumas espécies podem fazer a ligação entre o ciclo silvestre e peridoméstico, por possuírem hábitos sinantrópicos como as espécies de marsupiais (Roque & Jansen, 2014).

Devido à grande proximidade com o homem e ao intenso parasitismo cutâneo, o cão (*Canis familiaris*) é o animal doméstico mais importante como reservatório de *Leishmania infantum* nos centros urbanos (Ryan et al; 2003; Borja et al., 2016; Laurenti et al., 2013). Na literatura já foi descrita a infecção de cães com outras espécies além da *L. infantum*: *L. tropica*, *L. major* (Baneth et al., 2017), *L. braziliensis* (Quaresma et al., 2009) e *L. amazonensis* (Valdivia et al, 2017).

De acordo com alguns autores, os cães apresentam uma grande importância na manutenção da doença, principalmente, em grandes metrópoles, por serem reservatórios naturais do parasito e por estarem associados aos casos de epidemia e por manter a endemicidade da LV no meio urbano (Teixeira-Neto et. al, 2014; Teles et. al, 2015; Ursine et al., 2016; Campos et al., 2017).

A urbanização descontrolada tem trazido graves problemas para as comunidades, como: falta de saneamento básico, acúmulo de lixo nos espaços urbanos, enchentes e no âmbito social o desemprego, pobreza, falta de educação em saúde básica, propiciando o aparecimento de doenças infecto-parasitárias nos centros urbanos. Alguns autores apontam que a pobreza associada a fatores ecológicos/ambientais aumentam o risco da ocorrência de vetores,

principalmente, devido às más condições habitacionais e da precariedade na higiene ambiental, que favorece a proliferação do vetor (Ranjan et al., 2005; Bern, 2005; Quinnell, 1994).

Outro fator importante para o crescimento da LV nas grandes cidades, conseqüente a urbanização, foi o aumento da população canina nos grandes centros urbanos, aumentando a incidência da doença nos animais e conseqüentemente no homem. Como exemplo, podemos citar importantes cidades de Minas Gerais que passaram por este processo: Betim, Belo Horizonte, Governador Valadares, Montes Claros, Paracatu (Gontijo & Melo 2004, Cardoso et al., 2019; Prado et al., 2011; Dias et al., 2011).

Além do processo de urbanização, outros fatores podem contribuir para o aumento e redistribuição de casos da doença no Brasil, como o processo de migração humana e alterações ambientais causadas pelo homem (Berry & Berrang-Ford, 2016; Purse et al., 2017)

No intuito de monitorar e controlar a LV no Brasil, o MS desenvolveu um Programa de Controle da Leishmaniose Visceral no país. Como componente deste programa, a vigilância epidemiológica tem como finalidades reduzir as taxas de letalidade e grau de morbidade mediante a utilização de estratégias que incluem: inquérito sorológico canino, eutanásia dos cães positivos, controle químico do vetor, diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos e campanhas de prevenção da doença para alertar a população (Brasil, 2006).

Com relação ao controle da LVC no Brasil, uma das principais medidas adotadas e recomendadas pelo MS, desde 1963, é a eutanásia de cães soropositivos nos testes sorológicos realizados em inquéritos epidemiológicos (Dantas-Torres et al., 2018). Entretanto, a eficácia desta medida vem sendo questionada já que os testes sorológicos utilizados no diagnóstico destes animais não apresentam uma boa especificidade (Alves et. al, 2004).

Com isso, medidas complementares como a utilização de vacinas ou o uso de repelente em cães são almejadas, entretanto, a única vacina comercial licenciada e disponível para uso individual no Brasil (Leish-Tec), não faz parte das estratégias de controle propostas pelo MS devido à falta de comprovação da sua eficácia (Regina-Silva et al., 2016).

Sendo assim, outra medida de controle e prevenção da LVC que vêm sendo avaliada é a utilização da coleira impregnada por deltametrina, a fim de reduzir a infecção por *L. infantum* em cães e conseqüentes casos humanos da doença (Kazimoto et al., 2018; Coura-Vital et al., 2018)

## 1.2 Leishmaniose Visceral Canina

### *Histórico*

Até meados do século XIX, nenhum relato sobre LV em cães ou no homem havia sido descrito na literatura. Foi no ano de 1827 que o cirurgião militar William Twining publicou um artigo sobre pacientes em Bengal, Índia, com sinais clínicos compatíveis a LV (aumento no baço, febre e anemia).

Em 1908, o bacteriologista francês, Charles Jules Henry Nicolle, reportou casos de LV decorrentes da espécie *Leishmania infantum* em crianças na Tunísia e que apresentavam anemia esplênica. Neste mesmo ano Charles Comte e Nicolle encontraram cães infectados por *Leishmania* na Tunísia (Nicolle, 1908). A partir destes achados, os cães foram primeiramente descritos como um importante hospedeiro/reservatório de *Leishmania infantum* no Velho Mundo.

No Brasil, o primeiro relato de LV ocorreu em 1934 onde formas amastigotas do parasito foram achadas em lâminas histológicas do fígado de pacientes que vieram a óbito, com suspeita de febre amarela (Penna, 1934).

Entre os anos de 1936-1940, uma comissão liderada pelo pesquisador Evandro Chagas, juntamente com os colaboradores Leonidas Deane e Maria von Paumgarten, foi proposta para estudar o processo epidemiológico da LV. A pesquisa foi desenvolvida nos municípios de Abaetetuba e Mojú, próximos a Belém/Pará, onde haviam sido reportados 8 casos humanos da doença. Em algumas áreas foram encontrados 7 cães e 1 gato infectados, entretanto, nenhum animal silvestre apresentou-se doente (Chagas et. al, 1937).

Em 1954, Deane & Deane, associaram raposas da espécie, *Lycalopex vetulus*, como um importante reservatório do parasito no estado do Ceará. Já no ano de 1969, Lainson et. al. conseguiram isolar *Leishmania* de uma raposa da espécie *Cerdocyon thous* sem sinais clínicos aparentes no Pará. Com o desenvolvimento desses estudos foi possível observar que algumas espécies de canídeos apresentam um importante papel no ciclo de transmissão da *L. infantum* no Brasil.

A partir de 1980 grandes cidades brasileiras apresentaram casos autóctones da LV. Dentre elas: São Luís (MA), Teresina (PI), Natal (RN), Aracajú (SE), Fortaleza (CE), Rio de

Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Montes Claros e Sabará (MG). Em 1994, o primeiro caso autóctone de LVC foi confirmado em Belo Horizonte (MG), demonstrando a importância do cão como hospedeiro/ reservatório da *Leishmania* na área urbana (Maia-Elkhoury et al., 2008; Oliveira et al., 1999)

A partir de então, diversos estudos foram realizados sobre a infecção em cães tanto no ambiente rural como em centros urbanos e foi constatada a sua importância como reservatório do parasito e participação crucial nos ciclos de transmissão e manutenção de *Leishmania infantum* nestes ambientes (Dantas Torres, 2007; Teixeira Neto et al, 2014; Thomaz Soccol et al., 2017; Abrantes et al., 2018; Costa et al., 2018; Rocha et al, 2018).

#### *Etiopatogenia, manifestações clínicas e susceptibilidade de cães à infecção por L. infantum.*

Com o repasto sanguíneo realizado pelo flebotomíneo, formas promastigotas metacíclicas do parasito são inoculadas nos animais, sendo o tecido cutâneo o primeiro sítio de infecção (Killick-Kendrick, 1999). As áreas de preferência para a picada do inseto no animal são aquelas sem grande quantidade de pelos, como: focinho, pálpebras e pontas de orelha (Saridomichelakis, 2009).

No tecido cutâneo as formas promastigotas de *Leishmania* disseminam-se através da corrente sanguínea e infectam os macrófagos. Dentro dos macrófagos irá ocorrer a mudança da forma promastigota para amastigota (Bañuls et al., 2007). De acordo com Saridomichelakis (2009), os macrófagos exercem a função de transportar e distribuir *Leishmania* pelo corpo do hospedeiro, sendo que inicialmente, esta infecção aconteceria nos linfonodos e depois passaria para outros tecidos como medula óssea, baço, fígado e conjutiva ocular. Como o tecido cutâneo e o sangue são as primeiras vias de entrada do parasito para a infecção, estes tecidos servem como importantes marcadores na avaliação da capacidade de infecção vetorial (Borja, 2016).

Os principais sinais clínicos encontrados em cães infectados por *L. infantum* são: lesões na pele, linfadenopatia generalizada, perda de peso, atrofia muscular, intolerância ao exercício, perda do apetite, letargia, esplenomegalia, poliúria e polidipsia, alterações oculares, epistaxe, onicogribose, anemia, vômito e diarreia (Ciaramella et al., 1997; Koutinaset al., 1999; Baneth et al., 2008).

É importante ressaltar que estas manifestações clínicas consequentes ao processo de patogênese da LV, não acometem todos os cães de maneira uniforme. De acordo com Baneth et al., (2005) em uma mesma região, os cães apresentam uma variedade de manifestações clínicas que estão relacionadas com a carga genética e resposta imune de cada animal, podendo influenciar diretamente na resistência ou susceptibilidade dos mesmos à infecção.

Já se sabe que, o desenvolvimento da LVC está intimamente relacionado com o tipo de resposta imune do indivíduo. O cão terá uma resposta imune do tipo protetora quando esta for, predominantemente, mediada por células Th1, com estímulo a produção de citocinas que induzem a atividade *anti-Leishmania* pelos macrófagos. A resposta imunomediada por células Th2 irá induzir a produção de citocinas que irão estimular o linfócito B, com expressiva resposta humoral produtora de anticorpos *anti-Leishmania*, não tendo uma eficácia protetora contra o processo de infecção (Baneth, et al., 2008).

Cães mais resistentes à infecção e que não apresentam manifestações clínicas da doença, são considerados um grave problema para a saúde pública no país (Laurenti et al., 2013; Silva et al., 2016). Sendo assim, o entendimento e estudo dos mecanismos de patogênese da LVC são de fundamental importância para o desenvolvimento e melhoramento dos testes diagnósticos e consequente aprimoramento de medidas de controle e tratamento da doença.

#### *Principais métodos de diagnóstico da infecção por Leishmania*

Diferentes tipos de testes diagnósticos são utilizados na detecção do parasito. Estes testes contribuem para a confirmação da infecção, já que a LVC apresenta sinais clínicos semelhantes a outras enfermidades, não sendo diagnosticada, exclusivamente, pelo exame clínico e laboratorial do animal (Solano-Gallego et al., 2009). Sendo assim, os principais métodos de diagnóstico podem ser: sorológicos, parasitológicos e moleculares (Duthie et al., 2018).

#### *Sorológicos*

O TR DPP foi desenvolvido pelo Chembio Diagnostic Systems (Medford, NY, USA), sendo atualmente produzido por Biomanguinhos como um Dual-Path Platform (DPP®) LVC teste rápido (Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil). O teste apresenta a capacidade de detectar

anticorpos utilizando a proteína recombinante rK28 (antígenos rK9, rK39 e rK26), encontrada em *Leishmania infantum* (Mettler et al., 2005; Porrozzi et al., 2007).

Em 2011, foi realizado um ensaio de validação multicêntrica e o TR DPP® tornou-se o teste de triagem recomendado pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral/Ministério da Saúde do Brasil (Brasil, 2011). Atualmente, outros testes rápidos estão disponíveis no mercado, como o Alere Leishmaniose Ac Test Kit, Kalazar Detect e IDEXX Elisa.

Dentre as vantagens atribuídas a este tipo de ensaio tem-se a facilidade de poder ser usado em estudos a campo, sem requerer equipamentos sofisticados na realização da leitura, alta sensibilidade e especificidade e a utilização de pouca quantidade de amostra (Grimaldi Jr. et al., 2012). Entretanto, estudos epidemiológicos que utilizaram o TR DPP no diagnóstico da infecção de cães com *Leishmania* mostraram que o teste foi mais sensível na forma severa da doença, com manifestações clínicas evidentes, sendo menos eficaz na detecção de animais sem sinais clínicos (Quinnell et al., 1997; Courtenay et al., 2002; Figueiredo et al., 2018).

O ELISA é o teste de diagnóstico de escolha atualmente indicado pelo Ministério da Saúde para a confirmação dos casos de infecção canina por *Leishmania* no país, sendo utilizado nos inquéritos epidemiológicos, após a triagem com o TR DPP (Coura-Vital et al., 2014).

Até o ano de 2012 o teste utilizado na confirmação dos casos caninos era a IFI, enquanto que o ELISA era utilizado na triagem. Ambos os testes utilizavam amostras de soro ou sangue coletado em papel filtro (MS, 2006; Silva et al., 2011). Essa mudança ocorreu devido a alguns estudos terem estimado a sensibilidade da IFI em torno de 68% a 100% e especificidade entre 52% a 100%, enquanto que, o teste ELISA, apresentou sensibilidade de 91% a 97% e especificidade entre 83% a 98%, sendo maior quando comparado à IFI (Lira et al., 2006; Ferreira et al., 2007; da Silva et al., 2006; Scalone et al., 2002; de Arruda et al., 2013). Outra limitação relacionada à IFI é a possibilidade de reação cruzada em áreas onde há a ocorrência de outras doenças tripanossomatídeas (Ferreira et al, 2007; Madeira et al., 2009).

Enquanto que o ELISA pode ser facilmente padronizado e a sua leitura realizada de maneira automatizada por espectrofotômetro, a IFI necessita de uma pessoa treinada para realizar a leitura da fluorescência das formas promastigotas em lâminas, através da visualização em microscópio de fluorescência (Paltrinieri et al., 2016).



É importante ressaltar que os métodos indiretos citados, principalmente o TR DPP e o ELISA, utilizados nas campanhas de controle da LVC no Brasil, não apresentam 100% de especificidade e sensibilidade, fazendo com que estas técnicas ainda sejam falhas no diagnóstico da LVC. Considerando que no Brasil, resultados falso-positivos podem conduzir cães que não estejam infectados à eutanásia e resultados falso-negativos podem resultar na manutenção de cães infectados entre a população, testes diagnósticos que apresentem uma maior acurácia são de extrema importância. Além disso, a combinação de diferentes testes também poderia conduzir a diagnósticos mais confiáveis (Costa et al., 2015; Lopes et al., 2017; Laurenti et al., 2014).

### *Parasitológicos*

O método parasitológico de visualização direta das formas amastigotas do parasito é considerado pelo Ministério da Saúde como o teste de referência padrão-ouro. Ele apresenta 100% de especificidade, entretanto, possui algumas limitações como: baixa sensibilidade que irá variar com a carga parasitária do animal, via de coleta das amostras mais invasivas (punção de linfonodo, baço, medula óssea e pele) e por ser um método pouco prático em inquéritos epidemiológicos, devido ao grande número de cães a serem avaliados em curto período de tempo (MS, 2006).

Com o auxílio da técnica histológica é possível visualizar, pela coloração de eosina/hematoxilina, as formas amastigotas encontradas nas células de cães infectados. Entretanto, quando essa técnica é comparada com a PCR e o exame parasitológico, ela apresenta duas importantes limitações: é mais laboriosa e as formas amastigotas são mais difíceis de serem visualizadas. A sua vantagem está na possibilidade de diferenciar cães com lesões típicas de LV daqueles acometidos por outras enfermidades (Paltrinieri et al., 2016).

Com a finalidade de isolar o parasito dos tecidos de animais infectados com *Leishmania* a cultura é um método direto utilizado como exame laboratorial de diagnóstico. O meio de cultura mais utilizado no isolamento e crescimento das formas promastigotas da *Leishmania* spp. é o meio bifásico Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) (Nicolle, 1908). No entanto, esta técnica requer um longo período de observação o que o torna inviável para o diagnóstico rápido da doença.

Com o auxílio da técnica histológica é possível visualizar, pela coloração de eosina/hematoxilina, as formas amastigotas encontradas nas células de cães infectados. Já o método de imunohistoquímica pode ser utilizado como uma ferramenta auxiliar na confirmação dos casos de LVC, principalmente, em amostras com baixa carga parasitária (Paltrinieri et al., 2016; Tafuri et al., 2004).

### *Moleculares*

Métodos moleculares como a PCR vêm sendo largamente empregados no diagnóstico da infecção por *Leishmania*, principalmente, por apresentarem uma boa sensibilidade e especificidade. O diagnóstico utilizando a PCR convencional é baseado em uma amplificação *in vitro* de sequências específicas de nucleotídeos encontradas no parasito (Gomes et al., 2008).

Diferentes ensaios com variada gama de alvos, utilizando regiões do DNA genômico (gDNA) de *Leishmania*, bem como do cinetoplasto (kDNA), tem sido considerados os mais sensíveis na detecção do parasito, em diferentes tecidos de hospedeiros ou vetores (Gomes et al., 2008; Maia & Campino, 2008; Miró et al., 2008). Wirth e MacMahon-Pratt (1982) descreveram a ausência de hibridação cruzada entre o kDNA total de espécies dos complexos *L. braziliensis* e *L. mexicana*. Através desta descoberta, foram abertas novas direções no desenvolvimento de sondas baseadas nas moléculas do minicírculo, o maior componente do kDNA. O minicírculo está presente no kDNA em grande número de cópias, cerca de 10.000 e contém uma região conservada com 120 pares de base (pb), que pode ser evidenciada em cada molécula. Sendo assim, a clonagem de todo o minicírculo e fragmentos vem sendo utilizados na tipificação e detecção de espécies de *Leishmania* com sucesso (Barker & Butcher, 1983; Barker et al., 1986; Lopes & Wirth, 1986; Rogers et al., 1988).

Em estudo realizado por Moreira et al. (2007) foram comparados os métodos de diagnóstico: parasitológico, sorológico e molecular em cães com LV e com diferentes status clínicos. Neste estudo foi possível observar que a técnica de PCR convencional apresentou uma melhor sensibilidade quando comparada a outros testes, demonstrando, ser um eficiente método no diagnóstico da infecção por *Leishmania*.

As limitações da técnica estão relacionadas com a necessidade de utilização de equipamentos de ponta, mão de obra laboratorial qualificada, ausência de padronização entre

os diversos protocolos existentes e cuidados com a contaminação, já que a técnica é capaz de detectar pequenas quantidades de DNA do parasito (Roura et al., 1999).

Outra variação da PCR que vêm sendo amplamente empregada no diagnóstico e monitoramento de cães infectados por *Leishmania* é a PCR quantitativa (qPCR). Esta técnica permite o contínuo monitoramento dos produtos acumulados da PCR, durante o processo de amplificação da reação. Isso permite a identificação do ciclo inicial (threshold cycle) de produtos logarítmicos da PCR e, através de métodos de inferência, a quantificação precisa dos moldes de DNA presentes no início da reação (Gomes et al., 2008).

Bretagne et al. (2001) e Nicolas et al. (2002), foram os primeiros pesquisadores a descreverem dois métodos de qPCR para a detecção de *Leishmania*, utilizando como alvos o gene DNA polimerase e o DNA do minicírculo do cinetoplasto (kDNA). A partir deste feito, a técnica de qPCR vêm sendo empregada não somente na quantificação do parasito, mas também na identificação de espécies e genotipagem (Galluzzi et al., 2018).

A sensibilidade da qPCR irá depender do desenho do ensaio (tipo de primer e região alvo escolhidos), tipo de reagente utilizado (SYBER® Green - Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA ou TaqMan® Life Technologies - Foster City, CA, USA), tipo de amostras clínicas, bem como, o método de extração empregado (manual ou kit comercial) (Gomes et al., 2017).

A qPCR desenvolvida para o diagnóstico de casos de LV em humanos, mostrou uma especificidade que pode variar entre 29,6 a 100% e uma sensibilidade entre 91,3 a 100% (Mohammadiha et al., 2013; Junior et al., 2013). Sendo assim, esta técnica poderá ser bem utilizada em casos onde a sensibilidade é crucial no diagnóstico (de Paiva-Cavalcanti et al., 2015). Este aumento na sensibilidade está diretamente ligado à escolha do alvo a ser detectado. Como citado na PCR convencional, os minicírculos estão presentes em milhares de cópias por célula e representam, aproximadamente, 95% do kDNA, sendo assim, este alvo é considerado ideal para o aumento da sensibilidade da qPCR na detecção de *Leishmania* spp. (Stuart et al., 2005; Jara et al., 2013; Ceccarelli et al., 2014).

As vantagens da qPCR em relação a PCR convencional é que ela ocorre em menor tempo, com menor risco de contaminação e apresenta melhor sensibilidade (Mortarino et al., 2004). Este fato pode ser observado em estudo realizado por Francino et al. (2006) onde foram comparados os resultados de 25 amostras de aspirado de medula óssea de cães positivos para LVC, entre as técnicas de PCR convencional e qPCR. Das 25 amostras analisadas, foi

possível detectar o DNA de *Leishmania* em 21 delas, em uma escala de 0,001 a 3.400 parasitos, na técnica de qPCR. Na PCR convencional, que normalmente é a técnica mais utilizada para diagnosticar cães com LV, amostras com menos de 30 parasitos/ $\mu$ L foram negativas o que correspondeu a 7 das 21 amostras (7/21). Sendo assim, a qPCR teve uma maior sensibilidade quando comparada com a PCR convencional, pois detectou um número maior de cães verdadeiros positivos.

*Importância do estudo da carga parasitária no monitoramento do tratamento de cães infectados por L. infantum.*

A qPCR também tem sido empregada no monitoramento de cães tratados com antiparasitários. Até 2016, não era permitido o tratamento de cães diagnosticados com LV, sendo a eutanásia destes animais uma das medidas de controle recomendadas pelo Ministério da Saúde (MS, 2006). Em 2017, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), juntamente com o MS, divulgou uma nota técnica (Nº11/2016/CPV/DFIP/DAS/GM/MAPA) na qual liberou a utilização do medicamento Milteforan<sup>TM</sup>, da empresa Virbac Saúde Animal, para ser utilizado por veterinários no tratamento de cães diagnosticados com LV.

Com essa medida, o emprego da qPCR pode ser de grande valia no monitoramento de cães tratados com Milteforan<sup>TM</sup>, sendo possível o acompanhamento da carga parasitária nos tecidos dos animais, durante e após o período de tratamento. Manna et al. (2008) realizaram um estudo para quantificar a carga parasitária de *Leishmania* em cães naturalmente infectados e tratados com Miltefosina. Com este estudo os autores puderam concluir que, a qPCR provou ser a técnica padrão ouro em casos ativos da doença, monitoramento da cura parasitológica de cães infectados e uma ótima ferramenta na detecção da infecção por *Leishmania* spp. em hospedeiros vertebrados, bem como nos vetores do parasito. Além disso, ela permite a diferenciação de importantes microrganismos patogênicos pela análise da curva de melting de produtos fluorescentes da PCR (Logan et al., 2001). Sendo assim, estudos que avaliem a quantidade de carga parasitária nos tecidos de cães são importantes para a eleição da melhor amostra biológica, que será utilizada pela qPCR para o monitoramento de cães infectados por *L. infantum*.

## 2. JUSTIFICATIVA

No contexto da crescente utilização e aprimoramento de técnicas baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), para o diagnóstico das enfermidades infecto-parasitárias, a PCR quantitativa se apresenta como uma valiosa ferramenta na avaliação de cura parasitológica de protocolos de tratamento e ensaios clínicos. Desta forma, esta metodologia poderá auxiliar nas estratégias de prevenção e controle da LVC. Esta técnica tem a capacidade de detectar pequenas cargas parasitárias em diferentes tecidos o que a torna muito aplicável nas situações epidemiológicas onde observamos um grande número de cães infectados sem sinais clínicos aparentes e com baixa carga parasitária. Considerando estes aspectos, o presente estudo se propôs a contribuir no aprimoramento do diagnóstico molecular da infecção por *Leishmania infantum*, pela avaliação da melhor amostra biológica a ser utilizada no diagnóstico de cães sem manifestações clínicas ou com diferentes graus da doença, aumentando a sensibilidade da técnica. Além disso, as análises realizadas neste estudo poderão subsidiar a escolha da melhor combinação tecido, alvo/status clínico para o monitoramento da infecção de cães com LV e que estejam sendo tratados com diferentes protocolos, utilizando imunoterapia e/ou quimioterapia e medicamentos (leishmanicidas e/ou leishmanioestáticas).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar a carga parasitária de *Leishmania infantum* em amostras biológicas de cães, naturalmente infectados, para o aprimoramento do diagnóstico molecular e monitoramento da infecção.

#### 3.2 Específicos

- Analisar a carga parasitária em amostras biológicas de punção de linfonodo poplíteo, medula óssea, swab conjutival e pele;
- Avaliar a associação da carga parasitária nas diferentes amostras com o status clínico dos animais;
- Definir a melhor amostra biológica para o diagnóstico molecular e monitoramento da infecção nos animais sem manifestações clínicas e com diferentes graus de severidade da LVC.

## 4. METODOLOGIA

### *Aspectos éticos*

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) (processo nº 071/2015).

### *Amostras biológicas*

Para a realização deste estudo foram utilizadas amostras de DNA de punção de linfonodo poplíteo e medula óssea, swab conjutival e pele, de 65 cães infectados por *Leishmania infantum* e provenientes do Centro de Controle de Zoonose (CCZ) do município de Betim/MG. Estes animais foram soropositivos pelo Teste Rápido Dual Path Platform (TR DPP) e no Ensaio Imunoenzimático (ELISA), e infectados por *Leishmania infantum* em pelo menos um dos tecidos avaliados pela técnica de PCR-RFLP utilizando como alvo o gene hsp70 (Garcia et al, 2004).

Os 65 cães foram divididos em três grupos, a partir dos sinais clínicos observados nesta população e de acordo com os escores apresentados no quadro 1. O *grupo 1* (n=12) foi composto por animais com zero pontos e sem manifestações clínicas da doença. O *grupo 2* (n=35) com animais de escore variando de 1 a 5 pontos e com manifestações clínicas moderadas e no *grupo 3* (n=18) foram incluídos os animais com escore variando de 6 a 11 pontos e manifestações clínicas intensas.

**QUADRO 1** - Pontuação atribuída para categorias variáveis associadas com a LVC obtidas de exame clínico dos animais investigados.

Categoria	Pontuação		
	0	1	2
Pele	Normal	Alterada (alopecia, descamação ou hiperqueratose localizada)	Lesão(s), úlceras, hiperqueratose disseminada
Peso	Normal	Magro	Caquético
Mucosa Oral e Ocular	Normal	Alteração discreta	Hiperêmica ou pálida
Ungula	Normal	Aumento discreto	Onicogribose
Baço	Normal	Aumento discreto	Palpável
Linfonodos	Não palpáveis	Aumento discreto	Palpável
Lesão oral-nasal	Ausente	Uma pequena lesão	Múltipla e/ou lesão grande
Lesão ocular (Secreção, opacidade da córnea, conjuntivite)	Ausente	Discreto (unilateral, seroso ou mucoso)	Intenso (bilateral, purulento)

**FONTE:** Elaborado pela Dra. Andreza Pain Marcelino e baseado nos sinais clínicos da população estudada.

#### *Quantificação da carga parasitária das amostras por qPCR*

A quantificação da carga parasitária contida nas amostras foi realizada pelo sistema de detecção com intercaladores não específicos SYBER® Green. A curva padrão foi construída a partir de diluições seriadas ao décimo da cultura de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/74/PP75), onde 200 fg de DNA equivalem a um parasito (Deborggraeve et al., 2008), e partindo da concentração equivalente a  $2 \times 10^5$  parasitos/ $\mu\text{L}$  até a concentração de  $2 \times 10^{-1}$  parasitos/ $\mu\text{L}$ .

A amplificação foi realizada no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Foram utilizados os iniciadores A: 5'(C/G)(C/G)(G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' e B: 5' GGG GAGGGG CGT TCT GCG AA 3', senso e anti-senso, respectivamente, dirigidos à região conservada do kDNA de *Leishmania* e que amplificam um fragmento de 120 pb (Degrave et al., 1994).

As reações foram preparadas com a adição de 1,0  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (A e B) a uma concentração de 10 pmoles por  $\mu\text{L}$ , 12,5  $\mu\text{L}$  de GoTaq® qPCR Master Mix(Promega), 5,0  $\mu\text{L}$  de DNA a uma concentração de 10 ng/ $\mu\text{L}$ , 5,5  $\mu\text{L}$  de água deionizada para completar o volume final da reação de 25  $\mu\text{L}$ . Após a aplicação das amostras a placa foi selada e colocada



no equipamento para que ocorresse amplificação, com as seguintes etapas: um ciclo de desnaturação a 95°C por 10 minutos; seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos para completa desnaturação, 65°C por 1 minuto com aquisição da fluorescência neste momento. Após o período de amplificação a análise de dissociação foi realizada em um ciclo adicional cuja temperatura aumentou de 60°C a 95°C a uma taxa de 0,3°C por segundo, com aquisição de fluorescência contínua.

Os resultados foram analisados utilizando o programa 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) onde foi avaliado: a curva de dissociação formada, intensidade de fluorescência da amostra a cada ciclo e a quantificação do número de cópias de DNA conforme a curva padrão da diluição seriada. A quantidade de DNA detectada foi convertida em número de DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$ , pelo fator de correção. Em seguida este número de DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$  foi normalizado pela quantidade de tecido utilizado na extração de DNA (20 mg para o tecido de pele e 200  $\mu\text{L}$  para os demais tecidos), juntamente com o volume no qual este DNA foi diluído para seu uso nas reações (200  $\mu\text{l}$ ), sendo o resultado final reportado em DNA de parasitos/ $\mu\text{l}$  (onde 1mg equivale à 1 $\mu\text{L}$ ) (Tupperwar et al., 2008).

#### *Análises estatísticas*

Para avaliar se a carga parasitária nos cães difere entre os tecidos analisados e entre os grupos clínicos (com ausência, moderada ou intensa manifestação clínica) foi utilizado, primeiramente, o teste de Shapiro-Wilk para verificar se os dados são ou não paramétricos.

Após esta primeira análise, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para detectar se há diferença na carga parasitária ao considerarmos mais de dois grupos.

No caso de se observar diferença entre os grupos, foi feito o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney para verificar entre quais grupos está a diferença. Valores de  $p < 0,05$  indicam diferença estatística significativa.

Foi realizado o teste de coeficiente de correlação de postos de Spearman para avaliar a intensidade de correlação entre a carga parasitária nos diferentes tecidos e o escore clínico dos animais. Se o resultado da correlação for próximo ou igual a 1, esta será forte ou perfeita, se o valor for próximo ou igual a -1, ela será fraca ou completamente oposta.

#### 4. RESULTADOS

A análise da carga parasitária pela qPCR nas amostras de pele, punção de linfonodo poplíteo, medula óssea e swab conjuntival dos 65 cães naturalmente infectados por *L. infantum* foi realizada considerando três cenários.

*Cenário 1: Avaliação da carga parasitária nos diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por Leishmania infantum*

Foram avaliadas pela qPCR amostras de DNA provenientes da pele, punção de linfonodo poplíteo, medula óssea e swab conjuntival dos 65 cães, naturalmente infectados por *L. infantum*.

A carga parasitária nas amostras de pele apresentou uma variação de 0,10 a  $97,6 \times 10^7$  (DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$ ), no linfonodo poplíteo de 0,007 a  $28,8 \times 10^5$  (DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$ ), na medula óssea de 0,059 a  $64,2 \times 10^4$  (DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$ ) e de 0,001 a  $12,3 \times 10^3$  (DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$ ) no swab conjuntival.

As médias e os respectivos desvios padrões (DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$ ) nos tecidos analisados foram: pele  $30,5 \times 10^6 \pm 13,2 \times 10^4$ , seguido de  $96,2 \times 10^3 \pm 41,1 \times 10^4$  no linfonodo poplíteo,  $15,2 \times 10^3 \pm 82,0 \times 10^3$  na medula óssea e  $34,4 \times 10 \pm 15,8 \times 10^2$  no swab conjuntival.

**TABELA 1** -Valores da variação da carga, média, desvio padrão e mediana dos 65 cães.

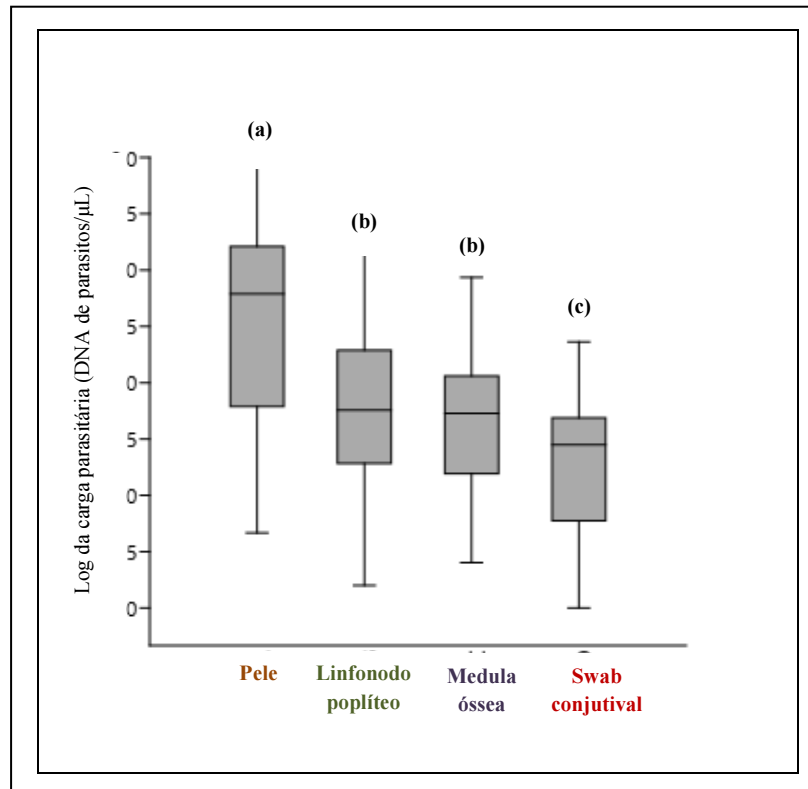
Tecido	Varição da carga	Média	Desvio padrão	Mediana
Pele	0,10 a $97,6 \times 10^7$	$30,5 \times 10^6$	$13,2 \times 10^4$	$23,40 \times 10^4$
Linfonodo	0,007 a $28,8 \times 10^5$	$96,2 \times 10^3$	$41,1 \times 10^4$	$18,62 \times 10^1$
Medula	0,059 a $64,2 \times 10^4$	$15,2 \times 10^3$	$82,0 \times 10^3$	$15,5 \times 10^1$
Swab	0,001 a $12 \times 10^3$	$34,4 \times 10$	$15,8 \times 10^2$	22,27

**FONTE:** Elaborado pela autora.

Ao analisarmos o gráfico 1 pode-se observar que a mediana da carga parasitária nas amostras de pele é a maior em relação aos outros tecidos e que o swab conjuntival apresentou a menor mediana. Os tecidos apresentaram diferença estatística significativa quando

comparados entre si ( $p < 0,05$ ), entretanto, não há diferença entre a carga parasitária das amostras de linfonodo poplíteo e da medula óssea.

**GRÁFICO 1** - Carga parasitária obtida nas amostras de DNA provenientes de diferentes tecidos dos cães infectados por *Leishmania infantum*.



Letras diferentes:  $p < 0,05$ ; letras iguais:  $p > 0,05$ .

**FONTE:** Elaborado pela autora.

**TABELA 2** -Valores de p no teste de Mann-Whitney.

Amostra	Pele	Linfonodo	Medula	Swab
Pele		4,38E-06	9,61E-08	6,24E-13
Linfonodo	4,38E-06		1	1,55E-04
Medula	9,61E-08	1,00E+00		0,003766
Swab	6,24E-13	1,55E-04	3,77E-03	

**FONTE:** Elaborado pela autora.

*Cenário 2: Avaliação da carga parasitária de cães por escore clínico*

*Grupo 1 (n=12, 0 pontos no escore clínico, sem manifestações clínicas)*

A carga parasitária nos cães deste grupo teve uma variação de 0,10 a 55,9 x 10<sup>6</sup> (DNA de parasitos/μL) na pele, 0,004 a 11,5 x 10<sup>5</sup> (DNA de parasitos/μL) no linfonodo poplíteo, 0,05 a 51 x 10<sup>3</sup> (DNA de parasitos/μL) na medula óssea e de 0,02 a 30,3 x 10 (DNA de parasitos/μL) no swab conjutival.

As médias e os respectivos desvios padrões (DNA de parasitos/μL) nos tecidos analisados foram: pele 47,2 x 10<sup>5</sup> ± 16,1 x 10<sup>6</sup>, seguido de 96,2 x 10<sup>3</sup> ± 33,1 x 10<sup>4</sup> no linfonodo poplíteo, 46,3 x 10<sup>2</sup> ± 14 x 10<sup>3</sup> na medula óssea e 57,4 x 10 ± 10,6 x 10<sup>1</sup> no swab conjutival.

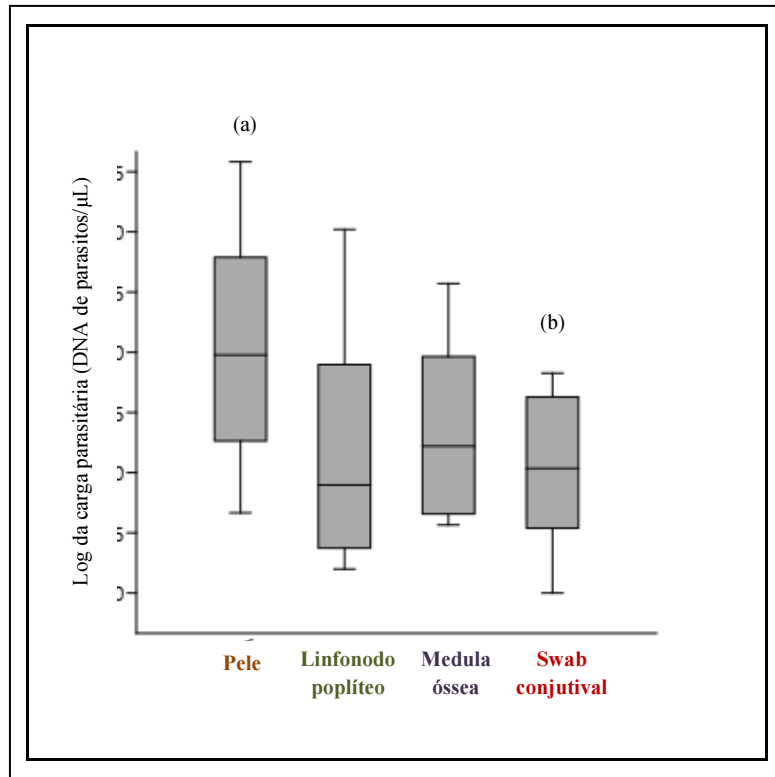
**TABELA 3** - Valores da variação da carga, média, desvio padrão e mediana do grupo 1.

<b>Tecido</b>	<b>Varição da carga</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mediana</b>
Pele	0,10 a 55,9 x 10 <sup>6</sup>	47,2 x 10 <sup>5</sup>	16,1 x 10 <sup>6</sup>	12,66 x 10 <sup>2</sup>
Linfonodo	0,004 a 11,5 x 10 <sup>5</sup>	96,2 x 10 <sup>3</sup>	33,1 x 10 <sup>4</sup>	0,49
Medula	0,05 a 51 x 10 <sup>3</sup>	46,3 x 10 <sup>2</sup>	14 x 10 <sup>3</sup>	4,79
Swab	0,02 a 30,3 x 10	57,4 x 10	10,6 a 10 <sup>1</sup>	1,3

**FONTE:** Elaborado pela autora.

A mediana da pele foi a maior em relação aos outros tecidos. A diferença estatística significativa (p<0,05) pode ser observada entre a pele e o swab conjutival representados no gráfico 2.

**GRÁFICO 2** - Comparação da carga parasitária entre os tecidos do grupo 1.



Letras diferentes:  $p < 0,05$ .

**FONTE:** Elaborado pela autora.

**TABELA 4** -Valores de p no teste de Mann-Whitney.

Amostra	Pele	Linfonodo	Medula	Swab
Pele		0,1572	0,278	0,0213
Linfonodo	0,1572		1	1
Medula	0,278	1		1
Swab	0,0213	1	1	

**FONTE:** Elaborado pela autora.

*Grupo 2 (n=35, escore clínico entre 1 e 5 pontos, manifestações clínicas moderadas)*

A carga parasitária teve uma variação de 2,94 a  $94,95 \times 10^6$  (DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$ ) na pele, 0,08 a  $28,81 \times 10^5$  (DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$ ) no linfonodo poplíteo, 0,04 a  $27,30 \times 10^3$  (DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$ ) na medula óssea e de 0,003 a  $12,33 \times 10^3$  (DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$ ) no swab conjutival.

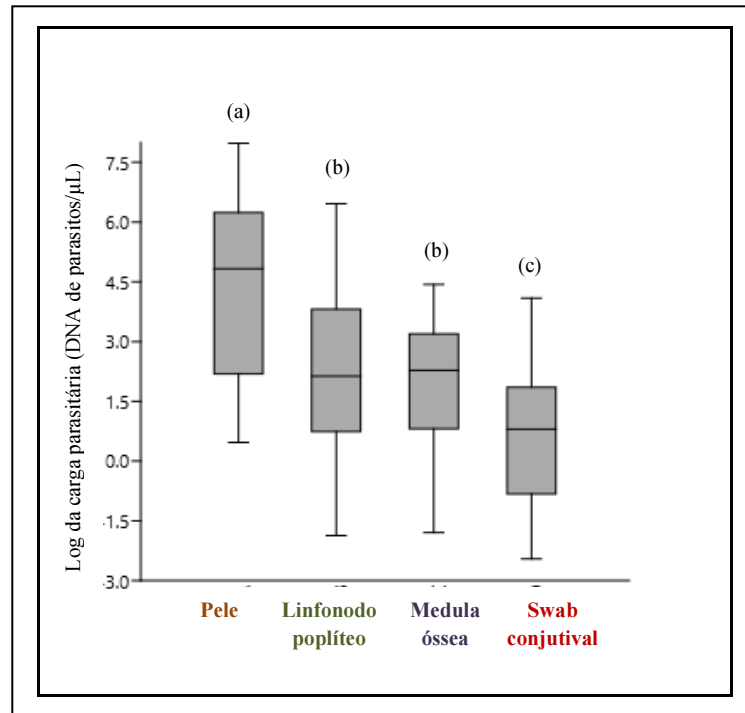
As médias e os respectivos desvios padrões (DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$ ) nos tecidos analisados foram: pele  $75 \times 10^5 \pm 21,7 \times 10^6$ , seguido de  $10,2 \times 10^4 \pm 49 \times 10^4$  no linfonodo poplíteo,  $25 \times 10^2 \pm 54,91 \times 10^2$  na medula óssea e  $42 \times 10^1 \pm 21 \times 10^2$  no swab conjutival.

**TABELA 5** - Valores da variação da carga, média, desvio padrão e mediana do grupo 2.

<b>Tecido</b>	<b>Varição da carga</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mediana</b>
Pele	2,94 a $94,95 \times 10^6$	$75 \times 10^5$	$21,7 \times 10^6$	$67,15 \times 10^3$
Linfonodo	0,08 a $28,81 \times 10^5$	$10,2 \times 10^4$	$49 \times 10^4$	$13,5 \times 10^1$
Medula	0,04 a $27,30 \times 10^3$	$25 \times 10^2$	$54,91 \times 10^2$	$19,18 \times 10^1$
Swab	0,003 a $12,33 \times 10^3$	$42 \times 10^1$	$21 \times 10^2$	6,38

**FONTE:** Elaborado pela autora.

A mediana da pele foi maior em relação aos outros tecidos e o swab conjutival apresentou a menor mediana. Os tecidos apresentaram diferença estatística significativa quando comparados entre si ( $p < 0,05$ ), entretanto, não há diferença entre a carga parasitária do linfonodo poplíteo e da medula óssea como representado no gráfico 3.

**GRÁFICO 3** - Comparação da carga parasitária entre os tecidos do grupo 2.

Letras diferentes:  $p < 0,05$ ; letras iguais:  $p > 0,05$ .

**FONTE:** Elaborado pela autora.

**TABELA 6** -Valores de p no teste de Mann-Whitney.

Amostra	Pele	Linfonodo	Medula	Swab
Pele		0,003355	0,001696	1,39E-07
Linfonodo	0,003355		1	0,00446
Medula	0,001696	1		0,008204
Swab	1,39E-07	0,00446	0,008204	

**FONTE:** Elaborado pela autora.

*Grupo 3 (n=18, escore clínico entre 6 e 11 pontos, manifestações clínicas intensas)*

A carga parasitária nas amostras de pele apresentou uma variação de 2,74 a  $97,6 \times 10^7$  (DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$ ), no linfonodo poplíteo de 33,3 a  $12,16 \times 10^5$  (DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$ ), na medula óssea de 0,1 a  $64,2 \times 10^4$  (DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$ ) e de 0,082 a  $27,10 \times 10^2$  (DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$ ) no swab conjuntival.

As médias e os respectivos desvios padrões (DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$ ) nos tecidos analisados foram: pele  $92,42 \times 10^6 \pm 24,16 \times 10^7$ , seguido de  $84,77 \times 10^3 \pm 28,50 \times 10^4$  no linfonodo poplíteo,  $46,33 \times 10^3 \pm 15,25 \times 10^4$  na medula óssea e  $38 \times 10 \pm 75,83 \times 10^4$  no swab conjuntival.

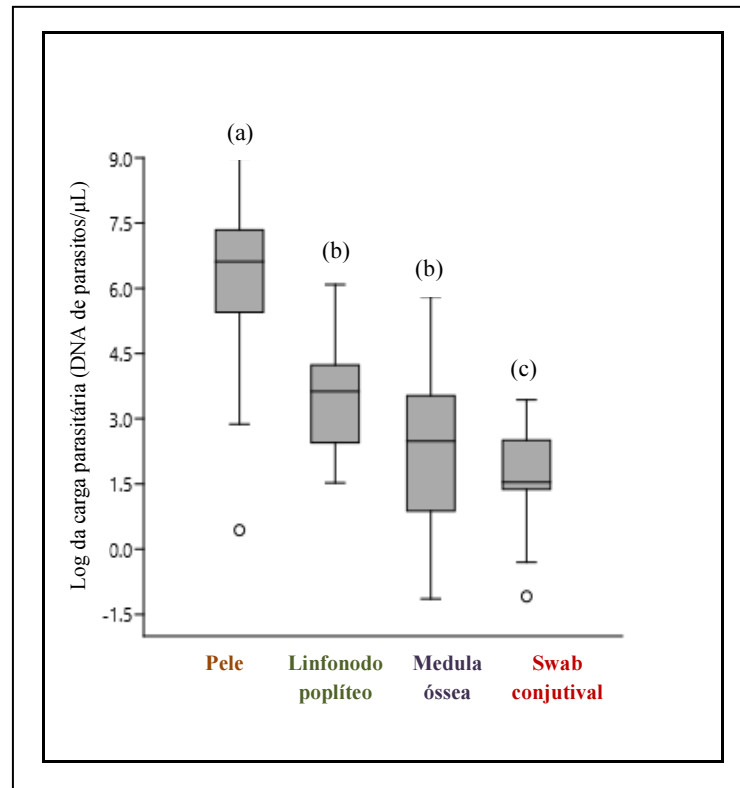
**TABELA 7** -Valores da variação da carga, média, desvio padrão e mediana do grupo 3.

<b>Tecido</b>	<b>Varição da carga</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mediana</b>
Pele	2,74 a $97,6 \times 10^7$	$92,42 \times 10^6$	$24,16 \times 10^7$	$41,82 \times 10^5$
Linfonodo	33,3 a $12,16 \times 10^5$	$84,77 \times 10^3$	$28,50 \times 10^4$	$42,95 \times 10^2$
Medula	0,1 a $64,2 \times 10^4$	$46,33 \times 10^3$	$15,25 \times 10^4$	$31,41 \times 10^1$
Swab	0,082 a $27,10 \times 10^2$	$38 \times 10$	$75,83 \times 10^4$	34,65

**FONTE:** Elaborado pela autora.

Ao analisarmos o gráfico 4 pode-se observar que a mediana da pele é a maior em relação aos outros tecidos e que o swab ocular apresentou a menor mediana. Os tecidos apresentaram diferença estatística significativa quando comparados entre si ( $p < 0,05$ ), entretanto, não há diferença entre a carga parasitária do linfonodo poplíteo e da medula óssea.



**GRÁFICO 4** - Comparação da carga parasitária entre os tecidos do grupo 3.

Letras diferentes:  $p < 0,05$ ; letras iguais:  $p > 0,05$ .

**FONTE:** Elaborado pela autora.

**TABELA 8** -Valores de p no teste de Mann-Whitney.

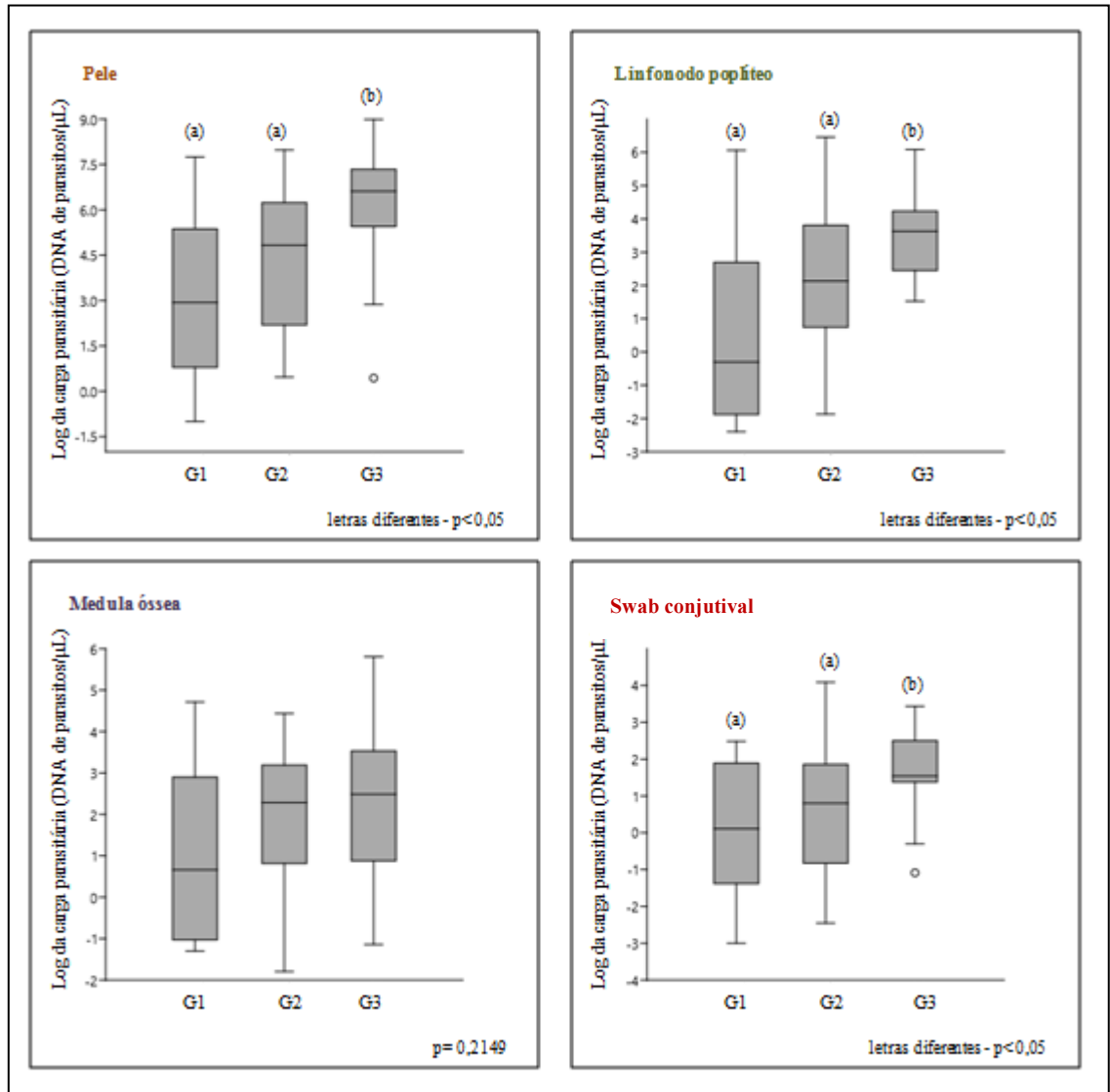
Amostra	Pele	Linfonodo	Medula	Swab
Pele		5,60E-04	1,66E-04	2,90E-05
Linfonodo	5,60E-04		0,2477	0,001065
Medula	1,66E-04	0,2477		1
Swab	2,90E-05	0,001065	1	

**FONTE:** Elaborado pela autora.

Ao compararmos os grupos: G1 (sem manifestações clínicas), G2 (com moderada manifestação clínica) e G3 (com intensa manifestação clínica), por tecido, foram observadas diferenças entre as medianas das cargas parasitárias, como representado no gráfico 5. Na pele e linfonodo poplíteo a diferença foi significativa entre os grupos G1/G2 e o grupo G3. Não foi observada diferença significativa entre as cargas parasitárias nos grupos G1, G2 e G3 quando

avaliadas as amostras de medula óssea. A carga parasitária das amostras de swab conjuntival apresentou diferença significativa entre os grupos G1 e G2 em relação ao grupo G3.

**GRÁFICO 5** - Comparação da carga parasitária entre os grupos por tecido.

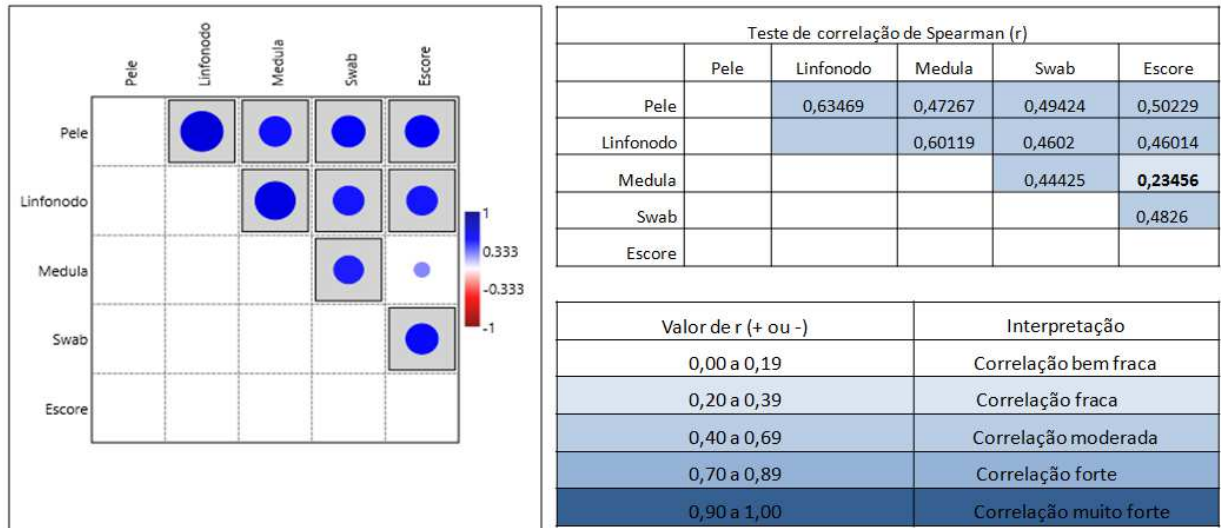


FONTE: Elaborado pela autora.

O teste de correlação de Spearman representado pela figura 1 indica haver uma correlação positiva (mais próxima de 1) entre a carga parasitária observada em todos os tecidos e o escore clínico dos cães. As amostras de pele, linfonodo poplíteo e swab conjuntival apresentaram uma correlação positiva e moderada com o escore clínico, como apresentada pela figura 1. A medula óssea foi o tecido cujas amostras mostraram uma correlação fraca

com o escore clínico dos animais. Estas observações corroboram o que foi mostrado na análise apresentada no gráfico 5 onde a quantificação da carga parasitária nas amostras de medula óssea dos três grupos não apresentou diferença estatística.

**FIGURA 1** - Correlação entre a carga parasitária dos tecidos e o escore clínico dos cães.

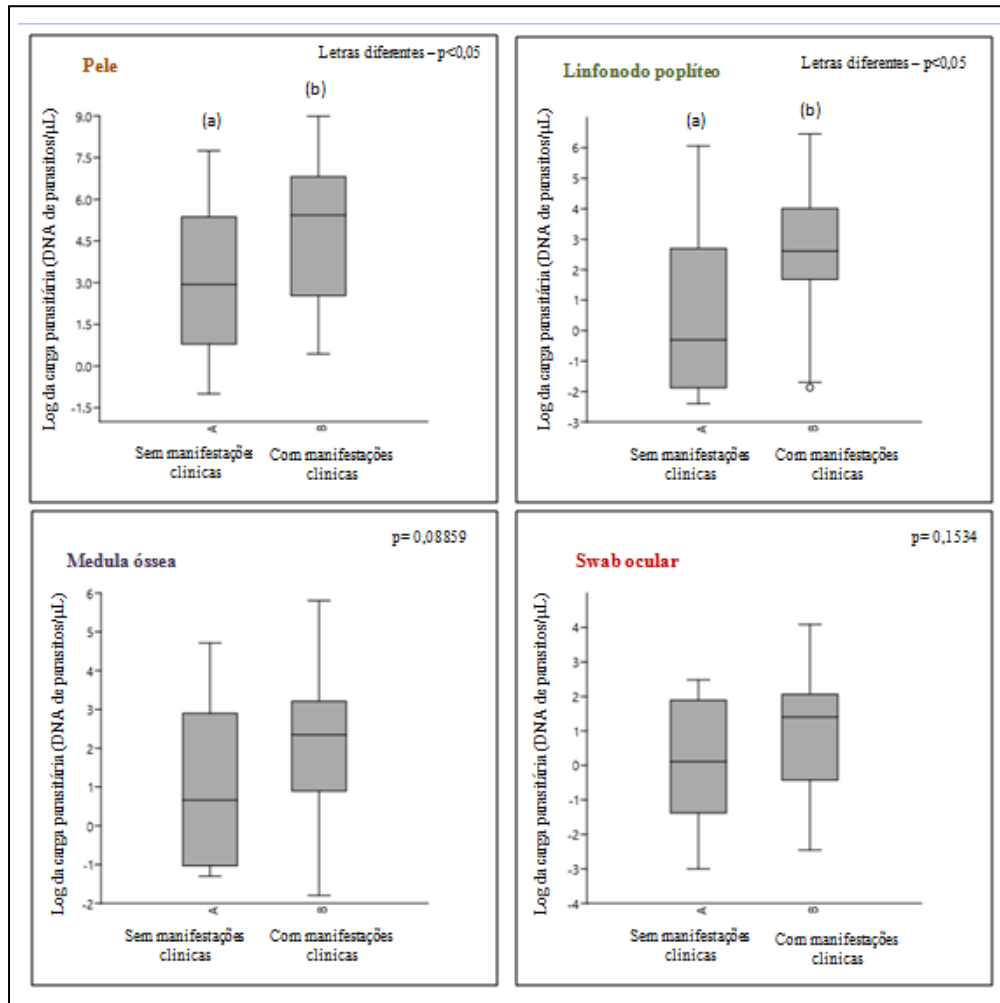


**FONTE:** Elaborado pela autora e baseado no artigo de Jonhson et al., (2014).

### *Cenário 3: Avaliação da carga parasitária de cães sem e com manifestações clínicas*

Ao compararmos a carga parasitária nos tecidos entre os grupos sem e com manifestações clínicas foi observada diferença entre as medianas da pele e linfonodo poplíteo ( $p < 0,05$ ). Entretanto, não houve diferença significativa entre as cargas parasitárias da medula óssea e swab conjutival, sendo o valor de  $p > 0,05$ . Os resultados estão representados no gráfico 6.

**GRÁFICO 6** - Comparação da carga parasitária entre os grupos por tecido.



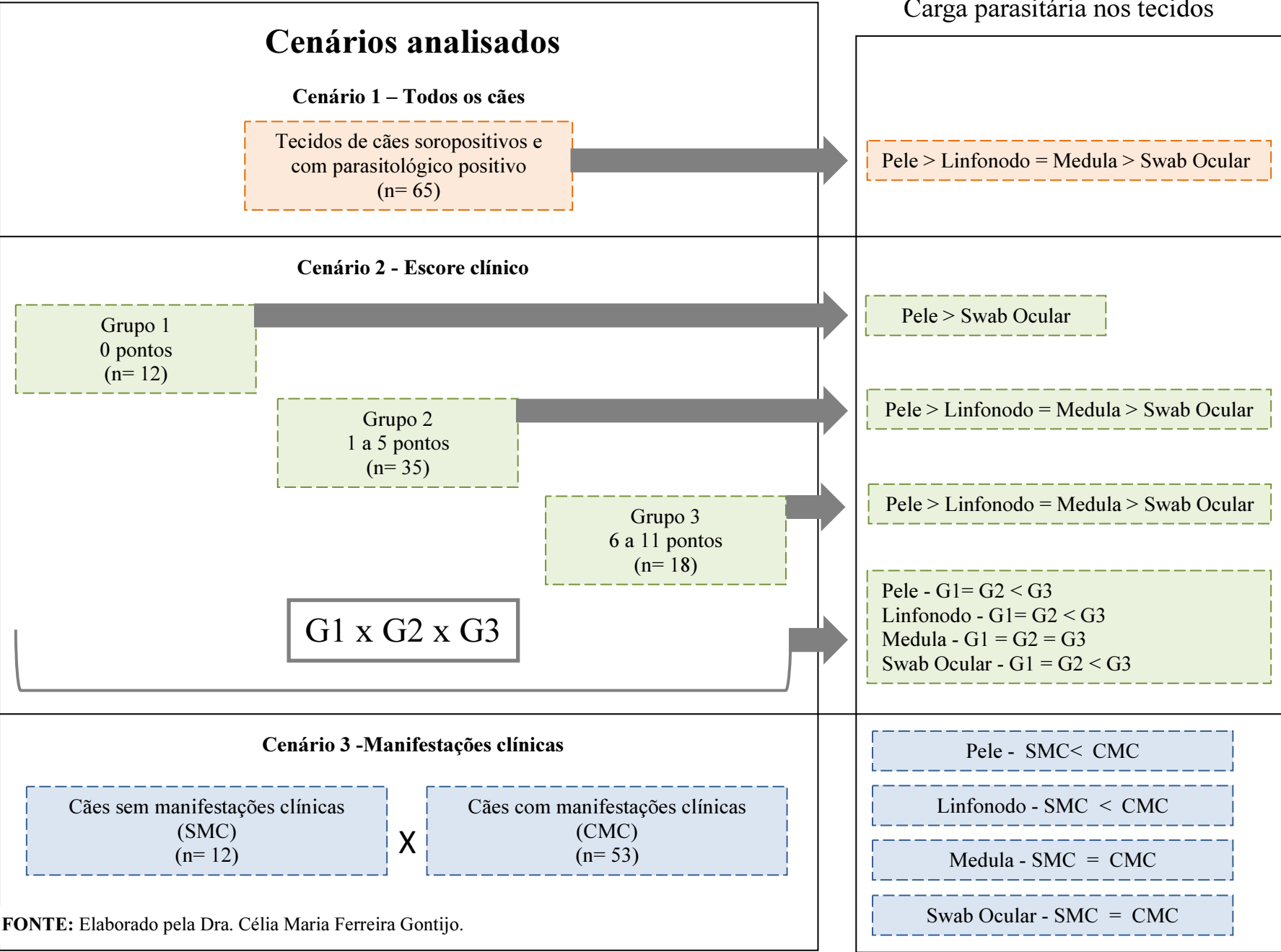
FONTE: Elaborado pela autora.

**TABELA 9** - Valores das medianas dos cães sem e com manifestações clínicas.

Tecido	Mediana	
	Sem manifestações	Com manifestações
Pele	12,66 x 10 <sup>2</sup>	26,74 x 10 <sup>4</sup>
Linfonodo	0,49	41,74 x 10 <sup>1</sup>
Medula	4,79	22,20 x 10 <sup>1</sup>
Swab	1,3	25,324

FONTE: Elaborado pela autora.

**FIGURA 2 -** Carga Parasitária nos Cenários Analisados.



**FONTE:** Elaborado pela Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo.

## 5. DISCUSSÃO

A importância do papel do cão no contexto da leishmaniose visceral, principalmente em áreas urbanas, é indiscutível. Entretanto, a medida de controle preconizada pelo Ministério da Saúde do Brasil em relação ao reservatório doméstico tem sofrido severas críticas por parte dos tutores, veterinários clínicos e setores da comunidade científica. Os estudos que avaliaram a eficácia da eutanásia de cães soropositivos como medida para diminuir a prevalência da infecção em cães e consequentemente em humanos não encontraram evidências consistentes (Melo et al., 2018). Após a liberação do uso da miltefosina, o tratamento da leishmaniose visceral canina tem sido apontado como uma alternativa à eutanásia. Porém, o tratamento deve ser feito de forma responsável pelos veterinários e tutores, realizando o acompanhamento sistemático da carga parasitária dos animais. Estudo realizado por Borja et al., (2016) indicou que a carga parasitária na pele e sangue é um potencial biomarcador da infectividade de cães, naturalmente infectados por *L. infantum*, para o vetor.

Com o avanço da biologia molecular como ferramenta no diagnóstico de cães infectados por *L. infantum*, a qPCR vem sendo utilizada para a quantificação da carga parasitária em diferentes tecidos de cães, com ou sem manifestações clínicas, podendo ser empregada no diagnóstico, monitoramento da infecção durante o tratamento e em estudos clínicos de validação de vacinas (Francino et al., 2006; de Paiva Cavalcante et al., 2009; Quaresma et al., 2009; Andrade et al., 2011; Reis et al., 2013; Carvalho et al., 2018).

No presente estudo, foi utilizada a qPCR tendo como alvo o kDNA de *Leishmania*. Isso porque este alvo apresenta um maior número de cópias no genoma mitocondrial do parasito, aumentando assim, significativamente, a sensibilidade das técnicas moleculares na detecção e tipificação de *Leishmania* spp. nos diferentes tipos de tecidos (Jara et al., 2013; Lukes et al., 2002).

Foi empregada nas qPCRs, o sistema SYBR Green, composto de pequenas moléculas que se ligam a dupla fita do DNA e que amplificam o sinal de detecção da técnica. O sistema SYBR Green é caracterizado por uma boa especificidade e sensibilidade, além de, apresentar menor custo quando comparado ao sistema de sondas TaqMan (Galuzzi et al., 2018).

No primeiro cenário, o estudo se propôs avaliar a carga parasitária no tecido cutâneo, swab conjuntival e punções de linfonodo poplíteo e medula óssea dos 65 cães soropositivos sem levar em consideração informações sobre o status clínico dos animais.

A escolha para a avaliação da carga parasitária nas amostras provenientes da punção de linfonodo poplíteo e do swab conjuntival, deu-se devido à coleta de amostras nestes tecidos serem menos invasivas. A utilização de amostras com coleta menos invasiva pode ser útil em situações onde os tutores não permitem a realização de coletas invasivas ou as condições locais de suporte técnico e material sejam precárias.

A medula óssea por ter um importante papel na imunopatogenia da infecção e apresentar um parasitismo significativo e o tecido cutâneo por ser considerado um potencial marcador da infectividade do cão para o flebotomíneo também foram amostras selecionadas para o estudo (Maia et al., 2009; Carson et al., 2010; Borja et al., 2016).

Como resultado deste cenário, a pele foi o tecido que apresentou a maior quantidade de DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$  e o swab conjuntival obteve a menor. Neste contexto, resultado semelhante foi encontrado por Ferreira et al., (2012) que avaliaram a detecção e quantificação de DNA de *L. infantum*, pela qPCR, em tecidos de pele, swab conjuntival, sangue e medula óssea de cães provenientes de Belo Horizonte.

Sudarshan et al., (2014) sugerem que através da utilização da qPCR, cães com baixa carga parasitária e que não apresentem manifestações clínicas da doença, poderão ser corretamente diagnosticados, já que métodos como a PCR convencional ou, particularmente, testes sorológicos como o TR DPP e o ELISA utilizados nas campanhas epidemiológicas do país, apresentam baixa sensibilidade e especificidade quando comparados a PCR quantitativa.

Interessantemente observamos que as amostras de medula óssea e linfonodo poplíteo não apresentaram diferença significativa na quantidade de DNA de parasitos/ $\mu\text{L}$  corroborando com os resultados encontrados por Ramos et al. (2013). Entretanto, os níveis de parasitismo nestes tecidos foram elevados indicando que a punção de linfonodo poplíteo é um tecido promissor para o diagnóstico da LVC por ser de coleta menos invasiva (Ikonopoulou et al., 2003; Lombardo et al., 2012; Ramos et al., 2012).

Considerando os resultados do cenário 1, diante de uma situação onde não se tem informações sobre o status clínico dos cães, podemos sugerir a utilização de amostras de pele

ou linfonodo poplíteo como os tecidos eleitos para o diagnóstico confirmatório da infecção por *Leishmania infantum*.

No cenário 2, foram avaliadas as cargas parasitárias dos mesmos tecidos do cenário 1, levando em consideração o escore clínico dos animais infectados por *L. infantum*. Ao avaliarmos os resultados por grupo, a pele foi o tecido que apresentou à maior quantidade de DNA de parasitos/L, e o swab conjuntival a menor independentemente do escore clínico dos animais.

Estes achados reforçam a importância do tecido cutâneo do cão como um bom marcador de infectividade para o flebotomíneo, principalmente, nos grandes centros urbanos onde são encontrados cães com diferentes graus de parasitismo (Laurenti et al., 2013; Borja et al., 2016) confirmando o relevante papel destes animais na manutenção do ciclo epidemiológico da doença (Maia-Elkhoury et al., 2008 ; Oliveira et al., 1999).

Os menores valores da carga parasitária observados nas amostras de swab conjuntival quando comparados aos dos outros tecidos, em todos os grupos clínicos, podem estar relacionados a diferentes aspectos. Um deles seria o próprio método de coleta que não propicia a obtenção de um grande volume de amostra, diminuindo as chances de detecção. Além disso, as características intrínsecas do olho, em especial da mucosa conjuntival, podem dificultar o acesso e o estabelecimento do parasito no local.

É importante ressaltar que não houve diferença significativa entre as cargas parasitárias nas amostras de medula óssea e do linfonodo poplíteo, entre os cães dos grupos 2 e 3. Sendo assim, este resultado sugere a utilização do aspirado de linfonodo poplíteo (uma técnica menos invasiva) em substituição a punção de medula, para o monitoramento da infecção em cães com manifestações clínicas da doença, moderadas ou intensas.

Um interessante resultado foi observado no cenário 2 ao compararmos a carga parasitária entre os diferentes grupos por tecido. Neste contexto, os resultados demonstraram que a quantidade de DNA de parasitos/ $\mu$ L em cada tecido foi semelhante entre os grupos 1 e 2 e menor quando comparada ao grupo 3. Exceção para as amostras de medula óssea que não apresentaram diferença significativa na carga parasitária nos diferentes grupos classificados pelo escore clínico.

Uma explicação para este resultado seriam as observações feitas em estudos que mostraram diferenças na intensidade da resposta imune celular que se desenvolve em cada



compartimento do organismo dos cães. Estas diferenças refletem a especificidade da interação que é estabelecida entre a *L. infantum* com cada órgão/tecido regulando os efeitos do parasitismo no cão. Barbosa et al., (2011) mostraram que a medula óssea de cães assintomáticos e sintomáticos mostraram níveis de citocinas pró inflamatórias similares aos dos animais saudáveis, sugerindo ausência de resposta imune específica contra *Leishmania* spp. neste compartimento.

Até o presente momento, não conhecemos estudos que relatam a avaliação da carga parasitária, pela qPCR, em cães divididos por escore clínico, sendo o nosso estudo pioneiro. Isso é importante, pois os resultados mostraram ser o tecido cutâneo o mais parasitado em cães com diferentes escores clínicos. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre a quantidade de DNA de parasitos/ $\mu$ L e o escore clínico desses animais. Resultado semelhante foi observado por Pereira-Fonseca et al., (2016), entretanto, estes autores classificaram os animais sem e com sinais clínicos sem considerarem o escore clínico dos cães sintomáticos.

Vale ressaltar que os sinais clínicos associados com a leishmaniose visceral nos cães são altamente variáveis como consequência de diferentes mecanismos patogênicos e diferentes respostas imunes que refletem na carga parasitária nos diferentes órgãos e tecidos. Os estudos que avaliam a carga parasitária de cães em diferentes tecidos e escore clínico podem apresentar algumas limitações. Isso é uma consequência dessa grande variedade da carga parasitária nos animais tornando os dados bastante heterogêneos. Este fato foi observado em nosso estudo, pois constatamos uma grande variabilidade nas cargas parasitárias mesmo dentro de um único grupo clínico. Com isso as observações podem não refletir a situação real de um indivíduo. Portanto, quando a abordagem for de caráter individual, como, por exemplo, o acompanhamento do tratamento da infecção, as comparações devem ser feitas considerando o próprio indivíduo no tempo zero, isto é, antes do tratamento.

Outro aspecto interessante que pode ser evidenciado é que a quantificação da carga parasitária nas amostras de tecido cutâneo, linfonodo e swab ocular do grupo 2 foram mais similares as do grupo 1 (sem sinais clínicos) do que dos animais do grupo 3 (com sinais clínicos), ou seja, os cães que apresentavam sinais intensos da infecção.

Considerando os resultados do cenário 2, diante de uma situação onde se tem informações sobre o status clínico dos cães, podemos indicar a utilização de amostras de pele ou linfonodo

poplíteo como os tecidos eleitos para o diagnóstico confirmatório da infecção por *Leishmania infantum* como também para o monitoramento da infecção.

Ao levarmos em consideração os resultados do cenário 3, onde os animais foram divididos em grupos de cães sem e com manifestações clínicas, o tecido cutâneo e o linfonodo poplíteo apresentaram cargas parasitárias maiores no grupo com manifestações clínicas, corroborando com os resultados encontrado por Borja et al., (2016) e Aschar et al., (2016).

Entretanto, não houve diferença significativa das cargas parasitárias da medula óssea e do swab conjutival entre estes dois grupos, o que difere do resultado encontrado por Ferreira et al., (2012), onde cães com manifestações clínicas da doença apresentaram uma maior carga parasitária na medula e swab conjutival, quando comparados aos cães sem manifestações.

Sendo assim, em situações onde se conhece as condições clínicas dos cães o tecido cutâneo e o aspirado de linfonodo poplíteo também foram os tipos de amostras mais indicados para o monitoramento da infecção por *L. infantum*.

Com os resultados encontrados no presente estudo, a qPCR mostrou ser uma importante técnica para o diagnóstico e monitoramento de cães infectados por *L. infantum*. Entretanto, devido ao seu elevado custo proveniente de equipamentos, reagentes e infra-estrutura e a necessidade de mão obra qualificada, essa realidade ainda não pôde ser implantada em países com alta incidência da doença como o Brasil. Porém, como perspectiva, poderá haver um laboratório central de qPCR para cada área endêmica do país, o que auxiliaria no diagnóstico e controle da doença (Sudarshan et al., 2014).

Além disso, o estudo demonstrou que o tecido cutâneo apresentou carga parasitária maior quando comparado as amostras provenientes de swab conjutival e aspirados de linfonodo poplíteo e medula óssea nos três cenários avaliados, sendo o tecido de eleição para o monitoramento de cães naturalmente infectados por *L. infantum* com diferentes status clínicos. Esta constatação é importante do ponto de vista epidemiológico porque além de ser o tecido mais eficaz no diagnóstico e monitoramento da infecção também poderá ser utilizado de forma eficiente como biomarcador da infectividade dos cães infectados para o inseto vetor.

## 6. CONCLUSÕES

- A pele foi o tecido com maior carga parasitária quando comparada ao aspirado de linfonodo poplíteo, medula óssea e swab conjutival em todos os cenários analisados;
- As amostras de aspirado de linfonodo poplíteo foram eficientes na detecção da infecção e podem ser indicadas para o diagnóstico em situações onde é necessária a utilização de coleta menos invasiva;
- O tecido cutâneo foi o que apresentou a correlação mais forte com o escore clínico em comparação aos demais tecidos, sendo o mais indicado para o diagnóstico e monitoramento da infecção por *Leishmania infantum* em animais sem manifestações clínicas ou com diferentes graus de severidade da doença.

## REFERÊNCIAS

- ABRANTES, T. R., Werneck, G. L., Almeida, A. S., Figueireido, F. B. Environmental factors associated with canine visceral leishmaniasis in an area with recent introduction of the disease in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 34, 2018.
- ALVAR, J., Yactayo, S., Bern, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*, 22,12, 2006.
- ALVES, W. A., Bevilacqua, P. D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997, *Caderno de Saúde Pública*, 20, 259-265, 2004.
- ANDRADE, H. M., Toledo, V. P. C. P, Pinheiro, M. B., Guimarães, T. M. P. D., Oliveira, N. C., Castro, J. A., Silva, R. N., Amorim, A. C., Brandão, R. M. S. S., Yoko, M., Silva, A. S., Dumont, K., Ribeiro Jr., M. L., Bartchewsky, W., Monte, S. J. H. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 181, 83–90, 2011.
- ASCHAR, M., Oliveira, E. T. B., Laurenti, M. D., Marcondes, M., Tolezano, J. E., Hiramoto, R. M., Corbett, C. E. P., Matta, V. L. R. Value of the oral swab for the molecular diagnosis of dogs in different stages of infection with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 225, 108-113, 2016.
- BANETH, G. Leishmaniasis. In: Greene GE. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3 ed. Philadelphia, 2005.
- BANETH, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 24, 324–330, 2008.
- BANETH, G., Yasur-Landau, D., Gilad, M., Nachum-Biala, Y. Canine leishmaniosis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: comparative findings and serology. *Parasites & Vectors*, 10, 113, 2017.
- BAÑULS, A. L., Hide, M., Prugnolle, F. *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, 64, 1-109, 2007.
- BARBOSA, M. A. G., Santos-Gomes, G. M. Cytokine Gene Expressin in the Tissues of Dogs Infected by *Leishmania infantum*. *Journal of Comparative Pathology*, 145, 4, 336-344, 2011.
- BARKER, D. C., Butcher, J. The use of DNA probes in the indentification of leishmaniasis: discrimination between isolates of the *L. mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77, 285-297, 1983.
- BARKER, D. C., Gibson, L. J., Kennedy, W. P. K., Nasser, A. A. A. Williams, R. H. The potential of using recombinant DNA species specific probes for the indentification of tropical *Leishmania*. *Parasitol.*, 91, 139-174, 1986.

BERN, C. et al. Risk factors for kala-azar in Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 655-662, 2005.

BERRY, I., Berrang-Ford, L. Leishmaniasis, conflict, and political terror: A spatio-temporal analysis. *Social Science & Medicine*, 167, 140-149, 2016.

BEZERRA, J.M.T., Araújo, V.E.M., Barbosa, D.S., Martins-Melo, F. R., Werneck, G.L., Carneiro, M. Burden of leishmaniasis in Brazil and federal units, 1990-2016: Findings from global burden of disease study 2016. *PLOS Neglected Tropical Disease*. 12, 1-19, 2018.

BORJA, L. S., Sousa, O. M. F; Solcà, M. S., Bastos, L. A., Bordoni, M., Magalhães, J. T., Laranjeira, D. F., Barrouin-Melo, S. M., Fraga, D. B. M., Veras, P. S. T. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Veterinary Parasitology*, 229, 110-117, 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Brasília: SVS, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral: recomendações clínicas para redução da mortalidade. Brasília: SVS, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Nota Técnica Conjunta N° 01/2011 CGDT/CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL; Ministério da Agricultura, Pecuária Abastecimento. Ministério da Saúde. Portaria interministerial nº1.426 de 11 de julho de 2008. Brasília, DF, 2008. Disponível em: [http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/outras\\_normas/portal1426.pdf](http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/outras_normas/portal1426.pdf)> Acesso em: 03 de janeiro 2019.

BRETAGNE, S., Durand, R., Olivi, M., Garin, J-F., Sulahian, A., Rivolletti, D. et al. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin. Vaccine Immunol.*, 8, 828-831, 2001.

CAMPOS, R., Santos, M., Tunon, G., Cunha, L., Magalhães, L., Moraes, J., Ramalho, D., Lima, S., Pacheco, J. A., Lipscomb, M., Ribeiro de Jesus, A., Pacheco de Almeida, R. Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. *Geospatial Health*, 12, 2017.

CARDOSO, M. S., Bento, G. A, de Almeida, L. V., de Castro, J. C., Reis-Cunha, J. L., Barbosa, V. A., de Souza, C. F., Brazil, R. P., Valdivia, H. O., Bartholomeu, D. C. Detection of multiple circulating *Leishmania* species in *Lutzomyia longipalpis* in the city of Governador Valadares, southeastern Brazil. *PLoS One*, 2, 14, 2019.

CARSON, C., Quinnell, R. J., Holden, J., Garcez, L. M., Deborggraeve, S., Couternay, O. Comparison of *Leishmania* OligoC-TesT PCR with Conventional and Real-Time PCR for Diagnosis of Canine Leishmania. *Infection. Journal of Clinical Microbiology*, 48, 3325–3330, 2010.

CECCARELLI, M., Galluzzi, L., Migliazzo, A., Magnani, M. Detection and characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. *PLoS One*, 9, 2014.

- CIARAMELLA, P., Oliva, G., Luna, R. D., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A., Persechino, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Rec.*, 141, 539-543, 1997.
- COSTA, L. N., Borba, A. S., Castagna, C. L., Carvalho Filho, E. B., Marson, F. A., Sá Junior, F. F., Angerami, R. N., Levy, C. E. Evaluation of PCR in the diagnosis of canine leishmaniasis in two different epidemiological regions: Campinas (SP) and Teresina (PI), Brazil. *Epidemiology & Infection*, 143, 1088–1095, 2015.
- COSTA, D. N. C. C., Blangiardo, M., Rodas, L. A. C., Nunes, C. M., Hiramoto, R. M., Tolezano, J. E., Bonfietti, L. X., Bermudi, P. M. M., Cipriano, R. S., Cardoso, G. C. D., Codeço, C. T., Chiravolloti-Neto, F. Canine visceral leishmaniasis in Araçatuba, state of São Paulo, Brazil, and its relationship with characteristics of dogs and their owners: a cross-sectional and spatial analysis using a geostatistical approach. *BMC Veterinary Research*, 14, 2018.
- COURTENAY, O., Quinnell, R. J., Garcez, L.M., Shaw, J. J., Dye, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J. Infect. Dis.* 186, 1314–1320, 2002.
- COURA-VITAL, W., et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral Leishmaniasis control program in Brazil and a New proposal for diagnosis. *PLoS ONE* 9, e91009, 2014.
- COURA-VITAL, W., Leal, G. G. A., Marques, L. A., Pinheiro, A. C., Carneiro, M., Reis, A. B. Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: A large scale intervention study in an endemic area in Brazil. *PLoS One*, 13, 2018.
- CHAGAS, E., Cunha, A. M., Castro, G. O., Ferreira, L. C. Leishmaniose Visceral Americana (Nova entidade mórbida do homem na América do Sul): relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 32, 1937.
- DANTAS-TORRES, F., Brandão-Filho, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 48, 3, 151-156, 2006.
- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 149, 139-146, 2007.
- DANTAS-TORRES, F., Miró, G., Bowman, D. D., Gradoni, L., Otranto, D. Culling dogs for zoonotic visceral leishmaniasis control: The wind of change. *Trends in Parasitology*, 2018.
- DEANE, M. P., Deane, L. M. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente infectadas pela *L. donovani*. *O Hospital*, 46, 651-653, 1954.
- DEANE, L. M. & DEANE, M. P. Observações sobre abrigos e criadouros de flebotomos no nordeste do Estado do Ceará. *Rev. bras. Malar.*, 9, 225-46, 1957

- DEBORGGRAEVE, S., Boelaert, M., Rijal, S., Doncker, S., Dujardin, J-C., Herdewijn, P., Büscher, P. Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and it's role in diagnosis of disease. *Tropical Medicine and International Health*. 13, 1378-1383, 2008.
- DEGRAVE, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopes, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a Mini-Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 89,463-469, 1994.
- DE CARVALHO, F. L. N., Riboldi, E. O., Bello, G. L., Ramos, R. R., Barcellos, R. B., Gehlen, M., Halon, M. L., Romão, P. R T., Dallegrove, E., Rossetti, M. L. R., Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. *Epidemiol. Infect.*,146, 5, 571-576, 2018.
- DE PAIVA-CAVALCANTI, M., Felinto de Brito, M. E., de Souza, W. V., de Miranda Gomes, Y., Abath, F. G. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. *Vet. J.*, 182, 2, 356-358, 2009.
- DE PAIVA-CAVALCANTI, M., de Moraes, R. C. S, Pessoa-e-Silva, R., Trajano-Silva, L. A. M., Gonçalves-de-Albuquerque, S. da C., Tavares, D. de H. C, et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci*, 5, 31, 2015.
- DIAS, E. S., Regina-Silva, S., França-Silva, J. C., Paz, G. F., Michalsky, E. M., Araújo, S. C., Valadão, J. L., de Oliveira Lara-Silva, F., de Oliveira, F. S., Pacheco, R. S., Fortes-Dias, C. L. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol*, 176, 101-111, 2011.
- DUTHIE, M. S., Lison, A., Courtenay, O. Advances toward diagnostic tools for managing zoonotic visceral leishmaniasis. *Trends in parasitology*, 34, 881-890, 2018.
- FERREIRA, E. C., de Lana M., Carneiro, M., Reis, A. B., Paes, D. V., et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.*, 146, 235–241, 2007.
- FERREIRA, S. A., Leite, R. S., Ituassu, L. T., Almeida, G. G., Souza, D. M., Fujiwara, R. T., Andrade, A. S. R., Melo, M. N. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 6, 2012.
- FIGUEIREDO, F. B., Vasconcelos, T. C. B., Madeira, M. F., Menezes, R. C., Maia-Elkhoury, Marcelino, A. P., Werneck, G. L. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis, 113, 1-7, 2018.
- FRANCINO, O., Altet, L., Sánchez-Rober, E., Rodriguez, Solano-Gallego, A., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A., Roura, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 137, 214–221, 2006.

- GALATI, E. A. B., Marassá, A. M., Fonseca, M. B., Gonçalves-Andrade, R. M., Consales, C. A., Bueno, E. F. M. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: 3. Serra district – area of hostels for tourists who visit the Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 54, 4, 665-676, 2010.
- GALLUZZI, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M., Magnani, M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 11, 273, 2018.
- GARCIA, L., Kindt, A., Bermudez, H., Llanos-Cuentas, A., De Doncker, S., Arevalo, J., Tintaya, K. W. Q., Dujardin, J-C. 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*, 42, 5, 2294-2297, 2004.
- GOMES, Y.M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R.A., Abath, F.G., Alves, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet. J.* 175, 45–52, 2008.
- GOMES, C. M., Cesetti, M. V., de Paula, N. A., Vernal, S., Gupta, G., Sampaio, R. N., et al. Field validation of SYBR green- and TaqMan based real-time PCR using biopsy and swab samples to diagnose american tegumentary leishmaniasis in an area where *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* is endemic. *J Clin Microbiol*, 55, 526–34, 2017.
- GONTIJO, C. M. F., Melo, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. bras. epidemiol.*, v. 7, nº3, 2004
- GRIMALDI, Jr. G., Tesh, R. B. & McMahon-Pratt, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41, 687-725, 1989.
- GRIMALDI, Jr. G., Teva, A., Ferreira, A. L., dos Santos, C. B., Pinto, Id., de-Azevedo, C. T., Falqueto, A. 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.*, 106, 1, 54-59, 2012.
- IKONOMOPOULOS, J., Kokotas, S., Gazouli, M., Zavras, A., Stoitsiou, M., Gorgoulis, V. G. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet. Parasitol.*, 113, 2, 99-113, 2003.
- JARA, M., Adai, V., Valencia, B. M., Martinez, D., Alba, M., Castrillon, C. et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J Clin Microbiol*, 51, 1826-1833, 2013.
- JUNIOR, M. S. C. L., Zorzenon, D. C. R., Dorval, M. E. C., Pontes, E. R. J. C., Oshiro, E. T., Cunha, R., et al. Sensitivity of PCR and real-time PCR for the diagnosis of human visceral leishmaniasis using peripheral blood. *Asian Pac J Trop Dis.*, 3, 1, 10–5, 2013.
- KAZIMOTO, T. A., Amora, S. S. A., Figueiredo, F. B., Magalhães, J. M. E., Freitas, Y. B. N., Sousa, M. L. R., Melo, A. E. C. D. S., Campos, M. P., Alves, N. D., Werneck, G. L.



Impact of 4% Deltamethrin-Impregnated Dog Collars on the Prevalence and Incidence of Canine Visceral Leishmaniasis. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7, 356-363, 2018.

KILLICK-KENDRICK, R., Killick-Kendrick, M. Biology of sandfly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick R, ed. *Canine Leishmaniasis: an Update*. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, Spain, Hoechst Roussel Vet, 26–31, 1999.

KOUTINAS, A. F., Polizopoulou, Z. S., Saridomichelakis, M. N., et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: aretrospective study of 158 cases (1989–1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 35, 376–383, 1999.

LAINSON, R., Shaw, J. J., Lins, Z. C. Leishmaniasis in Brazil: IV. The fox, *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para State, Brasil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 63, 6, 1969.

LAINSON, R., Rangel, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 100, 8, 811-827, 2005.

LAURENTI, M. D., Rossi, C. N., Matta, V. L., Tomokane, T. Y., Corbett, C.E., Secundino, N.F. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet. Parasitol.*, 196,296-300, 2013.

LAURENTI, M. D., de Santana Leandro, M. V. Jr., Tomokane, T. Y., De Lucca, H. R., Aschar, M., Souza, C. S., Silva, R. M., Marcondes, M., da Matta, V. L. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 205, 444–450, 2014.

LIRA, R. A., Cavalcanti, M. P., Nakazawa, M., Ferreira, A. G., Silva, E. D., Abath, F. G., Alves, L. C., Souza, W. V., Gomes, W. M. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniosevisceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-BioManguinhos kits. *Vet. Parasitol.*, 137, 11–16, 2006.

LOGAN, J.M.J., Edwards, K.J., Saunders, N. A., Stanley, J. Rapid identification of *Campylobacter* spp. by melting peak analysis of biprobes in real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 2227– 2232, 2001.

LOMBARDO, G., Pennisi, M. G., Lupo, T., Migliazzo, A., Capri, A., Solano-Gallego, L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology*, 184, 10–17, 2012.

LOPES, U. G., Wirth, D. F. Identification of visceral *Leishmania* species with cloned sequences of kinetoplast DNA. *Mol Biochem Parasitol*, 20, 77-84, 1986.

LOPES, E. G., Sevá, A. P, Ferreira, F, Nunes, C. M., Keid, L. B., Hiramoto, R. M., Ferreira, H. L, Oliveira, T. M. F. S., Bigotto, M. F. D., Galvis-Ovallos, F., Galati, E. A. B, Soares, R. M. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. *Epidemiology & Infection*, 145, 2436–2444, 2017.

- LUKES, J., Guilbride, D. L., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R., Englund, P.T. Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. *Eukaryot Cell*. 1, 495–502, 2002.
- MADEIRA, M.F., Sousa, M.A., Barros, J.H., Figueiredo, F.B., Fagundes, A., Schubach, A., De Paula, C.C., Faissal, B.N., Fonseca, T.S., Thoma, H.K., Marzochi, M. C. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology*, 136, 411–423, 2009.
- MAIA, C., Campino, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.* 158, 274–287, 2008.
- MAIA, C., Ramada, J., Cristovão, J. M., Gonçalves, L., Campino, L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *Veterinary Journal*, 179, 142–144, 2009.
- MAIA-ELKHOURY, A.N. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad. Saúde Pública* 24, 2941–2947, 2008.
- MANNA, L.; Gravino, A. E.; Picillo, E.; Decaro, N.; Buonavoglia, C. *Leishmania* DNA quantification by Real-time PCR in naturally infected dogs treated with Miltefosine. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases*, 2008.
- MELO, S. N., Teixeira-Neto, R. G., Werneck, G. L., Struchiner, C. J., Ribeiro, R. A. N., Sousa, L. R., de Melo, M. O. G., Carvalho Júnior, C. G., Penaforte, K. M., Manhani, M. N., Aquino, V. V., Silva, E. S., Belo, V. S. Prevalence of visceral leishmaniasis in a population of free-roaming dogs as determined by multiple sampling efforts: A longitudinal study analyzing the effectiveness of euthanasia. *Prev. Vet. Med.*, 161, 19-24, 2018.
- METTLER, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H. 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.*, 43, 5515–9, 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ª edição, 3ª reimpressão, Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 2006.
- MIRÓ, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G., Baneth, G. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.*, 24, 371–377, 2008.
- MOHAMMADIHA, A., Mohebbali, M., Haghghi, A., Mahdian, R., Abadi, A. R., Zarei, Z., 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*, 133, 89–94, 2013.
- MOREIRA, M.A.B.; Luvizotto, M.C.R.; Garcia, J.F.; Corbett, C.E.P.; Laurenti, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*, 2007.
- MORTARINO, M., Franceschi, A., Manciant, F., Bazzocchi, C., Genchi, C., Bandi, C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. *Parasitologia*, 46, 163–167, 2004.

NICOLAS, L., Prina, E., Lang, T., Milton, G. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 1666-1669, 2002.

NICOLLE, C. Três casos de infecção esplênica infantil com corpos de Leishman observados na Tunísia. *Arch Inst Pasteur Tunis*, 3–26, 1908.

NICOLLE, C., Comte C. Origine canine du kala-azar. *Bull Soc Pathol Exot*, 1, 299–301, 1908.

OLIVEIRA, C. L. A epidemiologia da Leishmaniose Visceral Humana em Belo Horizonte, 1994-1997. Mestre, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 128, 1999.

PALTRINIERI, C., Gradoni, L., Roura, X., Zatelli, A., Zini, Eric. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Veterinary Clinical Pathology*, 1-27, 2016.

PAHO. Pan-American Health Organization. Informe Epidemiológico das Américas Informe de Leishmanioses. Leishmanioses. Disponível em: <[http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34113/informe\\_leishmanioses\\_5\\_por.pdf](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34113/informe_leishmanioses_5_por.pdf)>. Acesso em: 15 de Outubro de 2018.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. *Bras Méd*, 48, 949-50, 1934.

PEREIRA, V. F., Benassi, J. C., Starke-Buzetti, W. A., Silva, D. T., Ferreira, H. L., Keid, L. B., Soares, R. M., Ruiz, V. L., Oliveira, T. M. Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival swab PCR. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 49, 1, 104-106, 2016.

PORROZZI, R., Santos da Costa, M. V., Teva, A., Falqueto, A., Ferreira, A. L., Santos, C. B., Fernandes, A. P., Gazzinelli, R. T., Campos-Neto, A., Grimaldi, G. Jr. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol*, 14, 544–8, 2007.

PURSE, B. V., Masante, D., Golding, N., Pigott, D., Day, J. C., Ibañez-Bernal, S., Kolb, M., Jones, L. How will climate change pathways and mitigation options alter incidence of vector borne diseases? A framework for leishmaniasis in South and Meso-America. *PLoS One*, 2017.

PRADO, P. F., Rocha, M. F., Sousa, J. F., Caldeira, D. I., Paz, G. F., Dias, E. S. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.*, 44, 561-566, 2011.

QUARESMA, P. F., Murta, S. M. F., Ferreira, E. C., Rocha-Lima, A. C. V. M., Xavier, A. A. P., Gontijo, C. M. F. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica*, 111, 289-294, 2009.

QUINNELL, R. J. & Dye, C. Correlates of the peridomestic abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Amazonian Brazil. *Med. Vet. Entomol.*, 8, 219–224, 1994.

QUINNELL, R. J., Courtenay, O., Garcez, L., Dye, C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian, Brazil. *Parasitology*, 115, 143–56, 1997.

RAMOS, R. A. N., Ramos, C. A. N., Jusi, M. M. G., Araújo, F. R., Machado, R. Z., Faustino, M. A. G., et al. Polymerase chain reaction and real-time PCR for diagnosing of *Leishmania infantum chagasi* in dogs. *Ver. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 3, 192-195, 2012.

RAMOS, R. A. N., Ramos, C. A. N., Santos, E. M. S., Araújo, F. R., Carvalho, G. A., Faustino, M. A. G., Alves, L. C. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in bone marrow, lymph node and spleen of dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 22, 3, 346-350, 2013.

RANJAN, A., Sur, D., Singh, V. P., Siddique, N. A., Manna, B., Lal, C. S., Sinha, P. K., Kishore, K., Bhattacharya, S. K. Risk factors for Indian kala-azar. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 74–78, 2005.

REIS, L. E., Coura-Vital, W., Roatt, B. M., Bouillet, L. É., Ker, H. G., Fortes de Brito, R. C., Resende, D. de M., Carneiro, M., Giunchetti, R. C., Marques, M. J., Carneiro, C. M., Reis, A. B. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Vet. Parasitol.*, 197, 498-503, 2013.

REGINA-SILVA, S., Feres, A. M., Franca-Silva, J. C., Dias, E. S., Michalsky, E. M., de Andrade, H. M., Coelho, E. A. F., Ribeiro, G. M., Fernandes, A. P., Machado-Coelho, G. L. L. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec (R) vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vaccine*, 34, 2233-2239, 2016.

ROCHA, M. A. N., Matos-Rocha, T. J., Ribeiro, C. M. B., Abreu, S. R. O. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in State of Alagoas, Northeast, Brazil, *Brazilian Journal of Biology*, 78, 609-614, 2018.

ROGERS, W. O., Burnheim, P. F., Wirth, D. F. Detection of *Leishmania* within sand flies by kinetoplast DNA hybridization. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 39, 434-439, 1988.

ROQUE, A. L. R., Jansen, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.*, 3, 251-262, 2014.

ROURA, X., Sanchez, A., Ferrer, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet. Rec.*, 1999.

RYAN, P. R., Arana, B. A., Ryan, J. R., Wirtz, R. A., Wortmann, G. W., Rizzo, N. R. The domestic dog, a potential reservoir for *Leishmania* in the Peten region of Guatemala. *Veterinary Parasitology*, 115, 1-7, 2003.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, 20, 471-489, 2009.

- SILVA, D. A., Madeira, M. F., Teixeira, A. C., de Souza, C. M., Figueiredo, F. B. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet. Parasitol.*, 179, 257–26, 2011.
- SILVA, F.M.F., Santos, E.M. S., Torres, S. M., Yamasak, E. M., Ramos, R.A. N., Alves, L.C. Parasite load in intact and ulcerative skin of dogs with leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 2016.
- SOLANO-GALLEGO, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 2009.
- SUDARSHAN, M., Sundar, S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in India visceral leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious disease*, 80, 40-42, 2014.
- STUART, K. D., Schnauffer, A., Ernst, N. L., Panigrahi, A. K. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem. Sci.*, 30, 97-105, 2005.
- TAFURI, W. L., Santos, R. L., Arantes, R. M. E., Gonçalves, R., Melo, M. N., Michalick, M. S. M., Tafuri, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of Immunological Methods*, 292, 17 - 23, 2004.
- TAVARES, C. A., Fernandes, A. P., Melo, M. N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, 3, 5, 657-667, 2003.
- TELES, A. P. S., Herrera, H. M., Ayres, F. M., Brazuna, J. C. M., Abreu, U. G. P. Fatores de risco associados à ocorrência da leishmaniose visceral na área urbana do município de Campo Grande/MS. *Hygeia. Rev. Bras. Geo. Med.Saúde*, 11, 35-48, 2015.
- TESH, R. B.; B. N. Chaniotis; B. R. Carrera & K. M. Johnson. Further studies on the natural host preferences of Panamanian phlebotomines sandflies. *American Journal of Epidemiology* 95, 88–93, 1972.
- TEXEIRA-NETO, R.G., da Silva, E.S., Nascimento, R.A., Belo, V.S., Oliveira, C.D.L., Pinheiro, L.C., Gontijo, C. M. Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. *Par. Vectors*, 7, 2014.
- TORRES-GUERRERO, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., Arenas, R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 2017.
- TUPPERWAR, N., Vineeth, V., Rath, S., Vaidya, T. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 61, 23-30, 2008.
- THOMAZ SOCCOL, V., Pasquali, A. K. S., Pozzolo, E. M., Leandro, A. S., Chiyo, L., Baggio, R. A., Michaliszyn, M. S., Silva, C, Cubas, P. H., Peterlle, R., Paz, O. L. S., Belmonte, I. L., Bisetto-Junior, A. More than the eyes can see:

The worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. PLoS One, 12, 2017.

TWINING, W. Observations on diseases of the spleen particularly on the vascular engorgement of that organ common in Bengal. Trans. Med. Phys. Soc. Bengal, 3, 351-412, 1827.

URSINE, R.L, Dias J. V. L., Morais, H. A., Pires, H. H. R. Human and canine visceral leishmaniasis in an emerging focus in Araçuaí, Minas Gerais: spatial distribution and socio-environmental factors. Mem Inst Oswaldo Cruz, 111, 505-511, 2016

VALDIVIA, O. H., Almeida, L. V., Roatt, B. M., Reis-Cunha, J. L., Pereira, A. A. S., Gontijo, C. M. F., Fujiwara, R. T., Reis, A. B., Sanders, M. J., Cotton, J. A., Bartholomeu, D. C. Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. Scientific Reports, 1-11, 2017.

WIRTH, D. F., McMahon Pratt, D. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 6810-6814, 1982

WORLD HEALTH ORGANIZATION: Weekly Epidemiological Record (WER), 91, 285–296, 2016.

## ANEXO

TABELA 10 - Resultado da PCR convencional e da qPCR dos 65 cães.

PCR convencional (120 pb)				qPCR (120 pb)			
Pele	Linf. Popl.	Medula Óssea	Swab Ocul.	Pele	Linf. Popl.	Med. Óssea	Swab Ocul.
<b>Grupo 1</b>							
+	+	-	+	360.463,57	766,8	0,106	1,081
-	-	-	+	339,16	0,07	33,441	20,772
+	+	+	+	55.885.990,00	1.150.279,38	1.164,54	303,16
-	-	+	+	12.881,15	0,03	2.587,83	1,53
+	+	-	-	2.192,95	131,36	6,17	0,02
+	+	-	-	0,10	0,01	0,05	0,00
-	-	+	-	262.979,58	0,479	247,27	0,047
-	-	-	-	2,81	0,00	0,05	0,20
-	+	+	+	161.499,60	4.027,42	51.539,099	120,757
-	-	-	-	139,435	0,51	1,51	1,81
+	+	+	+	64,02	24,185	3,419	239,783
S.R	S.R	S.R	S.R	2,83	0,01	0,09	0,04
<b>Grupo 2</b>							
+	-	-	+	10.431,661	0,02	0,059	12.330,79
-	+	-	+	154,72	250,717	7,316	S.A
+	+	+	+	61.589.322,42	S.A	22,281	2,353
+	+	+	+	1.589.212,40	4.832,54	27.303,58	110,25
+	+	+	-	9.349.644,20	51.949,56	205,78	0,02
+	+	+	+	141,18	4.261,38	133,23	25,218
+	+	+	+	5.962.615,28	130.378,50	4.338,36	759,043
-	+	-	-	94.952.100,60	36,717	0,238	0,422
-	+	+	-	260,10	6.093,05	24,26	0,238
+	+	+	+	3.781.679,75	300.204,41	12.710,12	0,17
-	-	-	-	1.172,35	0,848	0,04	0,36
+	+	+	+	252.212,80	55.936,15	8.729,08	25,92
-	+	+	-	290.905,25	7.784,5	1.652,43	0,20
-	-	-	-	19,36	0,685	0,016	0,03
+	+	-	+	340,96	148,122	177,853	317,313
+	+	+	+	3.307.979,05	2.881.039,7	3.903,63	45,526
-	-	-	-	16,00	1,09	4,53	0,04
-	+	+	+	207,23	91,75	750,04	5,67
+	-	S.A	-	22,27	0,0135	S.A	0,102
+	+	-	+	234.077,75	107,694	15,704	49,473
-	+	-	+	23.036,60	100,16	0,28	8,795
+	+	+	+	203.830,35	193,89	378,98	124,93
-	+	+	+	67.150,50	716,50	1.511,01	62,02
+	+	+	+	226.337,48	10.167,448	941,02	211,24
+	+	+	+	1.743.789,25	2.178,88	10.902,41	28,01
+	+	-	-	348,89	170,47	80,70	0,42
-	-	-	-	2,95	0,08	4,42	0,04
-	-	-	-	26,70	51,365	49,22	0,0035
-	+	-	-	3,97	2,66	37,86	0,78
+	-	+	+	70.580.708,80	1,681	516,114	113,068
-	+	-	-	15,15	7,49	0,23	0,01
+	+	+	-	7.173.790,80	123,55	7.827,537	0,0785
-	+	+	+	267.444,20	19.547,84	1.518,146	207,595
+	+	+	+	969.169,27	7,01	296,763	7,1
+	+	+	-	6.919,60	93,24	1.005,63	12,69
<b>Grupo 3</b>							
+	+	-	+	464.146,32	178,561	2,807	34,485
+	+	-	+	28.440.826,97	511,01	0,072	113,75
+	+	-	+	2.393.963,42	11.209,343	9,644	1,298
+	+	+	+	7.982.610,80	1.216.540,13	641.847,301	592,374
+	+	+	+	378.291.654,00	158.484,38	54,22	681,638
+	+	+	+	12.343,15	14.247,37	37.278,25	115,94
-	+	+	+	11.552.285,30	5.454,1	4.382,31	23,78
+	+	+	+	221.279.121,90	66.284,99	89,50	25,43
-	+	-	+	747,90	547,7	1,409	0,499
-	+	-	-	2,74	33,33	3,57	0,082
+	+	-	+	451.912,35	30.207,38	12,20	34,44
+	+	+	+	20.300.717,15	4.958,72	3.098,97	145,57
+	+	+	+	290.525,15	2.796,59	451,06	29,17
-	+	+	+	7.234.865,20	113,99	389,927	2.025,1
+	+	+	+	4.855.121,10	323,812	773,43	23,944
+	+	+	+	259.320,55	47,373	238,298	34,816
+	+	+	+	976.312.882,80	3.632,00	687,10	259,45
+	+	+	+	3.509.787,30	10.297,44	144.708,575	2.710,872

S.R: sem resultado; S.A: sem amostra.

FONTE: Elaborado pela autora.