

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM PESQUISA CLÍNICA

ARTUR AUGUSTO VELHO MENDES JUNIOR

**UTILIZAÇÃO DE AGULHA SEMIAUTOMÁTICA PARA COLETA DE AMOSTRAS
DE LINFONODO PARA O DIAGNOSTICO DA INFECÇÃO POR *Leishmania*
Leishmania infantum EM CÃES.**

Rio de Janeiro

2020

DISSERTAÇÃO MPPC- INI A. A. V. MENDES JUNIOR 2020

ARTUR AUGUSTO VELHO MENDES JUNIOR

**UTILIZAÇÃO DE AGULHA SEMIAUTOMÁTICA PARA COLETA DE AMOSTRAS
DE LINFONODO PARA O DIAGNOSTICO DA INFECÇÃO POR *Leishmania*
Leishmania infantum EM CÃES.**

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

Rio de Janeiro

2020

ARTUR AUGUSTO VELHO MENDES JUNIOR

**UTILIZAÇÃO DE AGULHA SEMIAUTOMÁTICA PARA COLETA DE AMOSTRAS
DE LINFONODO PARA O DIAGNOSTICO DA INFECÇÃO POR *Leishmania*
Leishmania infantum EM CÃES.**

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Rodrigo Caldas Menezes

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Isabela Did Ferreira Gremião (Presidente)

Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Instituto Nacional de Infectologia Lapclin-Dermzoo/INI-FIOCRUZ

Beatriz Brener de Figueiredo

Doutora em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz

Departamento de Microbiologia e Parasitologia/Instituto Biomédico-UFF

Luciana de Freitas Campos Miranda

Doutora em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas pelo Instituto Nacional de Infectologia.

Laboratório de Vigilância em Leishmanioses/INI-FIOCRUZ

VIDA

“Já perdoei erros quase imperdoáveis, tentei substituir pessoas insubstituíveis e esquecer pessoas inesquecíveis.

Já fiz coisas por impulso. Já me decepcionei com pessoas quando nunca pensei me decepcionar, mas também já decepcionei alguém.

Já abracei pra proteger e já dei risada quando não podia.

Já fiz amigos eternos. Já amei e fui amado, mas também já fui rejeitado.

Já fui amado e não soube amar. Já gritei e pulei de tanta felicidade, já vivi de amor e fiz juras eternas.

Já chorei ouvindo música e vendo fotos, já liguei só pra escutar uma voz, já me apaixonei por um sorriso.

Já pensei que fosse morrer de tanta saudade e...

...tive medo de perder alguém especial (e acabei perdendo)! Mas sobrevivi!

Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, porque o mundo pertence a quem se atreve e

A VIDA É MUITO

para ser insignificante"

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me presentear com a alegria da vida, me fortalecer diante das dificuldades e me capacitar para alcançar mais essa etapa.

Aos meus pais Artur e Adelaide (*In Memoriam*) que me criaram, dando todo o amor e carinho, não medindo esforços para que eu tivesse uma boa educação. Agradeço por todo apoio, incentivo e conselhos na tomada de minhas decisões.” E em especial a minha mãe que mesmo no momento mais difícil de sua vida se manteve firme e forte como uma verdadeira guerreira.

As minhas irmãs Renata e Rosângela e meus sobrinhos que me ajudaram a me manter firme e comprometido com esse objetivo, mesmo quando a vida nos colocou diante de um dos maiores desafios de nossas vidas, por sempre terem uma palavra amiga nos momentos difíceis e por se alegrarem em cada conquista.

A minha esposa, Ana Beatriz, por sempre estar presente em cada momento bom ou ruim, me presenteando com seu carinho, atenção, conselhos e incentivo.

Aos meus sogros por me incentivarem e apoiarem a todo momento.

Ao meu orientador, Dr. Rodrigo Menezes, pelo apoio, confiança e generosidade em dividir seus conhecimentos não só durante o curso de mestrado profissional, mas durante toda a minha trajetória na Fiocruz. Agradeço por me receber como aluno e confiar no meu desempenho.

À equipe do Laboratório de Vigilância em Leishmaniose – INI pela realização das culturas parasitológicas e identificação das espécies de *Leishmania*.

A equipe do Serviço de Anatomia Patológica – INI pela realização das técnicas histopatológicas e colorações especiais durante o estudo.

Ao Dr. Fabiano Borges Figueiredo, pela disponibilidade e pelo fundamental acompanhamento, correções e sugestões em cada etapa do estudo.

A toda equipe do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos pela amizade e apoio de sempre. Em especial ao técnico Adilson Benedito de Almeida e aos Médicos Veterinários Renato Orsini Ornellas, Shanna dos Santos, Isabela Maria Antônio e Lucas Keidel pela amizade e companherimo durante todo o estudo.

Aos técnicos Luiz Cláudio Ferreira e Célia Maria de Fátima, pela fundamental colaboração e apoio durante a execução das técnicas de diagnóstico.

UTILIZAÇÃO DE AGULHA SEMIAUTOMÁTICA PARA COLETA DE AMOSTRAS DE LINFONODO PARA O DIAGNOSTICO DA INFECÇÃO POR *Leishmania Leishmania infantum* EM CÃES. / Artur Augusto Velho Mendes Junior. - Rio de Janeiro, 2020.65 f.; il.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é considerada uma das principais parasitoses reemergentes no Brasil e no mundo e um importante desafio para a Saúde Pública. Possui como agente etiológico o protozoário *Leishmania infantum* e tem como seu principal vetor *Lutzomyia longipalpis*. O presente estudo tem como objetivo geral é avaliar a utilização da agulha semiautomática para coleta de amostras de linfonodo para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães utilizando amostras de linfonodo poplíteo coletadas através de punção por agulha semiautomática (PASA), punção por agulha fina (PAAF) e necropsia de linfonodo (NL). A coleta dos espécimes clínicos foi realizada em 30 cães soropositivos provenientes do município de Barra Mansa (RJ). O cão atendido, após passar por exame clínico, era submetido à sedação e em seguida a eutanásia. Posteriormente, foi realizada a coleta de amostras em um mesmo linfonodo poplíteo usando PASA, PAAF e NL. As amostras retiradas por essas técnicas foram armazenadas separadamente em tubos contendo solução salina estéril, para realização de cultura parasitológica (CP). Outro fragmento do mesmo linfonodo poplíteo coletado por NL foi armazenado em um frasco contendo formalina tamponada neutra a 10%, para realização de imuno-histoquímica (IHQ) e histopatologia por coloração hematoxilina-eosina (H.E). Nos 30 animais estudados, 26 (86%) apresentavam sinais clínicos compatíveis com Leishmaniose Visceral Canina. Os sinais clínicos que apresentaram as maiores frequências foram: esplenomegalia (76%), alterações dermatológicas (60%), linfadenomegalia (40%), hepatomegalia (36%), onicogrifose (30%). Vinte e nove cães (97%) foram positivos para *Leishmania* sp. no linfonodo em pelo menos uma das técnicas de diagnóstico utilizadas. As frequências de positividade para *Leishmania* spp. em amostras de linfonodo poplíteo pela técnica de diagnóstico em função do número de amostras coletadas para cada técnica, utilizada foram: 64 (71%) cultura parasitológica (CP), 21 (70%) imunohistoquímica (IHQ), e 10 (33,3%) hematoxilina-eosina (H.E). Os resultados em relação à frequência de positividade para *Leishmania* sp. por CP utilizando diferentes técnicas de coleta de amostra de linfonodo poplíteo nos animais estudados foram: 23 (77%) na NL, 22 (73%) na PAAF e 19 (63%) na PASA. A contaminação microbiológica na CP foi detectada em apenas 4 (4,4%) amostras das 90 analisadas e em apenas 8 (12,5%) amostras coletadas de um total de 64 amostras positivas o resultado não foi obtido na primeira leitura, excluído as amostras negativas e as amostras que registraram contaminação microbiológica. A técnica de coleta por PASA em linfonodo poplíteo combinada a cultura parasitológica se mostrou uma ferramenta útil para o diagnóstico de *L. infantum* em cães, com os resultados obtidos neste estudo podemos considerar o linfonodo (poplíteo) como um excelente tecido de escolha para o diagnóstico de *L. infantum*.

Palavras-chave: 1. *Leishmania infantum*. 2. Diagnóstico. 3. Cultura parasitológica. 4. Agulha semiautomática. 5. Cães

ABSTRACT

Use of a semi-automatic needle to collect lymph node samples for the diagnosis of *Leishmania Leishmania infantum* infection in dogs

American Visceral Leishmaniasis (AVL) is considered one of the main re-emerging parasitosis in Brazil and the world and an important public health challenge. It has as its etiological agent the protozoan *Leishmania infantum* and has as its main vector *Lutzomyia longipalpis*. The general objective of this study is to evaluate the use of the semiautomatic needle to collect lymph node samples for the diagnosis of *L. infantum* infection in dogs using popliteal lymph node samples collected through semiautomatic needle puncture (PASA), fine needle puncture (PAAF) and lymph node necropsy (NL). The clinical specimens were collected from 30 seropositive dogs from the municipality of Barra Mansa (RJ). The attended dog, after passing for clinical examination, was submitted to sedation and then to euthanasia. Later, samples were collected in the same popliteal lymph node using PASA, PAAF and NL. The samples taken by these techniques were stored separately in tubes containing sterile saline solution for parasitological culture (PC). Another fragment of the same popliteal lymph node collected by NL was stored in a flask containing 10% neutral buffered formalin for immunohistochemistry (IHQ) and histopathology by hematoxylin-eosin staining (H.E.). In the 30 animals studied, 26 (86%) presented clinical signs compatible with Canine Visceral Leishmaniasis. The clinical signs that presented the highest frequencies were: splenomegaly (76%), dermatological changes (60%), lymphadenomegaly (40%), hepatomegaly (36%), onychoglyphosis (30%). Twenty-nine dogs (97%) were positive for *Leishmania sp.* in lymph node in at least one of the diagnostic techniques used. The frequencies of positivity for *Leishmania spp.* in popliteal lymph node samples by the diagnostic technique as a function of the number of samples collected for each technique used were: 64 (71%) parasitological culture (PC), 21 (70%) immunohistochemistry (IHQ), and 10 (33.3%) hematoxylin-eosin (H.E). The results regarding the frequency of positivity for *Leishmania sp.* per PC using different techniques of popliteal lymph node sampling in the animals studied were: 23 (77%) in NL, 22 (73%) in PAAF and 19 (63%) in PASA. Microbiological contamination in the PC was detected in only 4 (4.4%) samples of the 90 analyzed and in only 8 (12.5%) samples collected from a total of 64 positive samples the result was not obtained in the first reading, excluding negative samples and samples that recorded microbiological contamination. The technique of PASA collection in polite lymph node combined with parasitological culture proved to be a useful tool for the diagnosis of *L. infantum* in dogs, with the results obtained in this study we can consider the lymph node (popliteum) as an excellent tissue of choice for the diagnosis of *L. infantum*.

Keywords: 1. *Leishmania infantum*. 2. diagnosis. 3. parasitological culture. 4. semiautomatic needle. 5. dogs

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Leishmaniose visceral	1
1.2 Ciclo biológico	5
1.3 Diagnostico da infecção por <i>Leishmania infantum</i> em cães.....	6
1.3.1 Diagnóstico sorológico	7
1.3.2 Diagnóstico parasitológico	9
1.3.3 Melhores sítios de coleta de amostras biológicas para diagnostico da LV em cães	11
1.3.4 Sensibilidades das diferentes técnicas de diagnóstico no linfonodo de cães para detecção de <i>Leishmania infantum</i>	12
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivos gerais	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. METODOLOGIA	18
4.1. Desenho do estudo e população alvo	18
4.2 Critérios de elegibilidade.....	18
4.2.1. Critérios de inclusão	18
4.2.2. Critérios de exclusão	19
4.3. Materiais, procedimentos e Técnicas	19
4.3.1. Manejo dos animais	19
4.3.1.1 Recepção, contenção e avaliação clínica	19
4.3.1.2 Coleta de espécimes clínicos para diagnóstico	20
4.4 Histopatologia	27
4.4.1 Hematoxilina-eosina	27
4.4.2 Imuno-histoquímica	28
4.5 Isolamento parasitario em meio de cultura.....	29
4.5.1 Eletroforese de enzimas	30
5. ANALISE ESTATISTICA	31

6. RESULTADOS	31
7. DISCUSSÃO	38
8. CONCLUSÕES	46
9. PROCEDIMENTO ÉTICO	46
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO A–FICHA DE INFORMAÇÕES E DADOS VETERINÁRIOS	63
ANEXO B–LICENÇA CEUA	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ASATM	Agulha semiautomática para tecidos moles
CB	Bloco celular “ <i>Cell Block</i> ”
CP	Cultura parasitológica
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPP®	Dual-Path Platform®
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática/Enzyme-linked immunosorbent assay
H.E	Hematoxilina-eosina
HP	Histopatologia
ICC	Imuno-citoquímica/ immunocytochemistry
IFI	Imunofluorescência indireta
IHC	Imunohistochemistry
IHQ	Imuno-histoquímica
LAPCLIN	Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em
DERMZOO	Animais Domésticos
LP	Linfonodo popliteo
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
LVC	Leishmaniose visceral canina
MLEE	Eletroforese de enzimas
MS	Ministério da Saúde
NL	Necropsia de linfonodo
N ₂ L	Nitrogênio líquido
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PASA	Punção por agulha semiautomática
PBS	Solução Salina Tamponada de Fosfato/Phosphate Buffered Saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PL	Punção de linfonodo

RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta/ Indirect
SEAP	Immunofluorescence Reaction
TBS	Serviço de Anatomia Patologica
VigiLeish	Solução Salina Tamponada Tris /Tris Buffered Saline Laboratório Vigilância em Leishmanioses
VL	Visceral leishmaniasis

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Sensibilidade do linfonodo frente as técnicas de diagnóstico de *L. infantum* em cães. Pág.14

Tabela 1. Frequência de sinais clínicos encontrada no grupo de 30 cães soropositivos para *Leishmania infantum* incluídos no estudo, provenientes do município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, entre 2018 e 2019. Pág 32

Tabela 2. Frequência de positividade para *Leishmania* sp. no linfonodo poplíteo de cães soropositivos para esse parasito utilizando a coleta por punção com agulha semiautomática (PASA) e exame por CP, comparada às coletas por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) e exame por CP e coleta por necropsia (NL) e exame por CP, HE e IHQ. Barra Mansa, Rio de Janeiro, entre 2018 e 2019. Pág.33

Tabela 3. Frequência de positividade para *Leishmania* sp. no linfonodo poplíteo de cães soropositivos para esse parasito em função da presença ou ausência da linfadenomegalia utilizando a coleta por punção com agulha semiautomática (PASA), punção aspirativa por agulha fina do linfonodo (PAAF) e por necropsia de linfonodo (NL) na CP. Barra Mansa, Rio de Janeiro, entre 2018 e 2019. Pág.33

Tabela 4. Casos positivos e negativos para *L. infantum* pela técnica de coleta PASA comparada a PAAF confirmados pela cultura parasitológica, Barra Mansa, Rio de Janeiro, entre 2018 e 2019. Pág.34

Tabela 5. Casos positivos e negativos para *L. infantum* pela técnica de coleta PASA comparada a NL confirmados pela cultura parasitológica, Barra Mansa, Rio de Janeiro, entre 2018 e 2019. Pág.34

Tabela 6. Casos positivos e negativos para *L. infantum* pela técnica de coleta PASA comparada a NL confirmados pela cultura parasitológica e histopatologia. Barra Mansa, Rio de Janeiro, entre 2018 e 2019. Pág.34

Tabela 7. Casos positivos e negativos para *L. infantum* pela técnica de coleta PASA comparada a NL confirmados pela cultura parasitológica e histopatologia. Barra Mansa, Rio de Janeiro, entre 2018 e 2019. Pág.35

Tabela 8. Frequência de positividade para *Leishmania* sp. em função dos tempos de leitura na cultura parasitológica em amostras de linfonodos poplíteos coletadas por meio das técnicas PASA, PAAF e NL. Barra Mansa, Rio de Janeiro, entre 2018 e 2019. Pág.37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Linfonodo poplíteo apresentando linfadenomegalia. Pág. 4

Figura 2: Ciclo de transmissão da leishmaniose. Pág. 6

Figura 3 A-B. Técnica de PAAF utilizada na punção do linfonodo poplíteo do animal. Pág. 21

Figuras 4: Agulha semiautomática utilizada para a realização de coleta de amostra de linfonodo poplíteo de cães soropositivos para *L. infantum* incluídos no estudo. Pág. 23

Figura 5: Imagem da agulha semiautomática para coleta em tecidos moles utilizada no estudo. Pág. 24

Figura 6: A. Esquema ilustrando a coleta em tecido utilizando a agulha semiautomática para tecidos moles. B. Imagem da cânula de coleta. Pág. 24

Figura 7: Esquema para coleta de amostra de linfonodo poplíteo de cão utilizando a agulha semiautomática para tecidos moles. (A) Identificação, tricotomia e posicionamento do linfonodo poplíteo. (B) Limpeza e antissepsia com clorexidine a 2%. (C). Antissepsia utilizando iodopovidona 10%. (D). Antissepsia utilizando álcool a 70%. (E) Fixação da guia para coleta por agulha semiautomática. (F) Agulha introduzida na guia, já fixa no tecido e pronta para a realização da coleta após seu disparo realizado ao apertar o gatilho. Pág. 25

Figura 8: Preparo da amostra de linfonodo poplíteo coletada por agulha semiautomática para a cultura parasitológica. (A) Retirada do fragmento do canal da agulha. (B) Fragmento já imerso em solução salina. Pág. 26

Figura 9 A-B. Preparo da amostra de linfonodo poplíteo coletada na necropsia, após a extração do órgão em bandeja de inox para a cultura parasitológica, histopatologia

e imuno-histoquímica. (A) Corte realizado transversalmente no linfonodo para dividi-lo em dois fragmentos: um para cultura parasitológica e o outro para histopatologia e imuno-histoquímica (B). Figura aumentada do linfonodo poplíteo. Pág. 27

Figura 10: Corte histológico de linfonodo poplíteo de cão mostrando formas amastigotas de *Leishmania* sp. coradas em castanho (setas) no citoplasma de macrófago. Imuno-histoquímica. Objetiva de 40x. Pág. 35

Figura11: Corte histológico de linfonodo poplíteo de cão mostrando formas amastigotas de *Leishmania* sp. (seta) no citoplasma de macrófago. Hematoxilina-eosina. Pág. 36

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose visceral

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças infecciosas crônicas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que acometem o ser humano e diferentes espécies de animais. Essas doenças apresentam diversas formas de manifestações clínicas e estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do Velho e do Novo Mundo. No Novo Mundo, as leishmanioses são classificadas clinicamente como leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA) (BRASIL, 2006a; W.H.O., 2011).

O protozoário *Leishmania infantum* (sin. *Leishmania chagasi*), pertencente à Família Trypanosomatidae, é o agente etiológico da leishmaniose visceral (LV). No Brasil o flebótomo da espécie *Lutzomyia longipalpis*, que transmite o parasito na forma flagelada, promastigota, para o hospedeiro vertebrado, onde sofre diferenciação para forma intracelular amastigota, que apresenta flagelo rudimentar (BRASIL, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). O flebótomo *Lutzomyia cruzi* também foi descrito no estado do Mato Grosso do Sul como vetor biológico de *L. infantum* (SANTOS et al., 1998).

É considerada uma doença tropical negligenciada e endêmicas em 98 países, com taxas de mortalidade variando de 20 a 40 mil óbitos por ano. Estima-se que ocorram entre 200 mil e 400 mil novos casos de LV a cada ano no mundo, sendo o Brasil um dos países mais acometidos (ALVAR et al., 2012). Segundo Montalvo et al. (2012), 90% dos casos de LV ocorrem em países onde existe grande parte da população em situação de pobreza (Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil). Portanto, o fator financeiro é um obstáculo para o controle da doença. No município de Barra Mansa-RJ, foram descritos recentemente nove casos de LV em humanos (PIMENTEL et al., 2014), o que levou autoridades de saúde locais a investigarem a circulação de *Leishmania* sp. na população de cães da região.

A partir do ano de 2011, um importante surto de LV em cães no município de Barra Mansa foi identificado e relatado por Mello et al. (2014). A LV é uma zoonose e o cão doméstico é apontado como principal reservatório de *L. infantum* em ambientes

urbanos (BRASIL, 2006). Além disso, tem sido descrito que a enzootia canina precede a ocorrência de casos em humanos, e que a prevalência de infecção é maior em cães que em humanos (PALATINIK-DE-SOUZA et al., 2001). Os cães podem albergar o parasito na pele mesmo em casos de infecção assintomática, consistindo em uma importante fonte alimentar aos insetos vetores (LAURENTI et al., 2013). Sob o ponto de vista epidemiológico e todos os animais identificados como reservatório para leishmaniose visceral, o cão é considerado o reservatório doméstico mais importante, sendo por esta razão um dos alvos do programa de controle da doença no Brasil (SILVA et al., 2014). A transmissão venérea também ocorre, pois, a frequência de *Leishmania* sp. no trato genital é alta em ambos sexos e em cães sintomáticos e assintomáticos, sugerindo que não há tropismo de acordo com o sexo e que mesmo os cães infectados assintomáticos têm o potencial de transmissão venérea deste parasito (BOECHAT et al., 2016). Anteriormente já foi detectado formas viáveis de *L. infantum* no útero de cadelas, indicando a possibilidade de transmissão vertical da leishmaniose visceral canina (LVC) (SILVA, et al., 2009; BOECHAT et al., 2016).

Contudo, em relação aos animais sabe-se que existem pelo menos 2,5 milhões de cães infectados apenas no sudoeste europeu (CORTES et al., 2012). Levando em consideração que a área de abrangência desta enfermidade já atinge 88 países, onde apenas 32 deles possuem serviços de notificação compulsória da doença (OMS, 2012) e não apenas cães podem ser infectados (MOLINA et al., 2012), é possível perceber por que as leishmanioses (não apenas a LV) são consideradas pela Organização Mundial da Saúde - OMS, como a segunda enfermidade de maior relevância entre as protozooses tropicais (LAINSON, 1985).

Antes, restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro, a LV avançou para outras regiões indenes, alcançando a periferia de grandes centros urbanos. A partir dos anos 90, os estados do Pará e Tocantins (região Norte), Mato Grosso do Sul (região Centro-oeste), Minas Gerais e São Paulo (região Sudeste) passaram a influenciar de maneira significativa nas estatísticas da LV no Brasil (BRASIL, 2006). Recentemente, foram relatados casos caninos autóctones na cidade de São Borja (RS), região sul do país, onde não havia registro da doença, demonstrando a sua expansão (SOUZA et al., 2014). Novos casos de LV têm sido descritos em áreas consideradas indenes para a doença, como por exemplo em municípios dos estados do Rio de Janeiro (SILVA et al., 2015), São Paulo (CARDIM et al., 2016), Rio Grande do Sul (SOUZA et al., 2014) e Piauí (PEREZ et al., 2016).

Classicamente, a leishmaniose visceral canina (LVC) pode apresentar um espectro de manifestações clínicas bem variadas, condicionadas à imunocompetência individual do animal. É uma doença sistêmica que pode acometer diferentes órgãos, principalmente a pele e os tecidos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, como baço, linfonodos e medula óssea (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014). Os principais sinais clínicos da LVC são: lesões cutâneas (dermatite esfoliativa, ulcerativa ou nodular; alopecia local ou difusa), linfadenomegalia, palidez de mucosas, perda de peso, atrofia muscular esquelética, lesões oculares (blefarite, uveíte, ceratoconjuntivite), epistaxe, hepato e esplenomegalia, onicogribose e síndrome nefrótica (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). *L. infantum* pode estar distribuída por vários órgãos por isso a LV em cães geralmente apresenta alterações clínicas tais como anemia normocítica normocrômica, trombocitopenia, hiperproteïnemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (FREITAS et al., 2017). Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo (ALMEIDA et al., 2005), podendo estes representar cerca de 40 a 60% da população soropositiva (MARZOCHI, 1997). O cão infectado por *L. infantum* pode apresentar-se de forma assintomática ou sintomática de intensidade variável, que em muitos casos, pode levar o animal a óbito (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).

Após a avaliação clínica e laboratorial, os cães podem ser classificados em quatro estágios. O primeiro estágio corresponde aos cães expostos, que apresentam diagnóstico parasitológico negativo, bem como baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* e clinicamente normais ou apresentando sinais associados com outras doenças. O segundo estágio são os cães infectados que apresentam exame parasitológico positivo, mas possuem baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, são clinicamente saudáveis ou apresentam sinais clínicos compatíveis com outras doenças. O terceiro estágio inclui os cães doentes, que possuem exames parasitológicos positivos e altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* com um ou mais sinais comuns na leishmaniose. O quarto estágio são os cães gravemente doentes, com condições clínicas graves, nefropatia ou insuficiência renal crônica, alterações oftálmicas, articulares, entre outros (PALTRINIERI et al., 2010).

Figura 1. Linfonodo poplíteo apresentando linfadenomegalia.



Fonte: Lapclin-Dermzoo INI/FIOCRUZ

Com o crescimento geográfico e a urbanização da LV é necessário estabelecer medidas de controle mais efetivas. Acredita-se que esta expansão para diversas regiões do Brasil pode ser atribuída a fatores como dificuldades na eliminação do reservatório, diversidade epidemiológica das regiões afetadas, capacidade adaptativa do vetor, medidas insuficientes no controle do vetor e alto custo financeiro e social (OLIVEIRA et al., 2008). Admite-se também que a urbanização decorra de modificações sócio-ambientais causadas por ações antrópicas, bem como pelo processo da migração de populações rurais para as periferias urbanas desprovidas de moradias e infraestrutura sanitária adequada, dividindo ainda o pequeno espaço com animais domésticos como os cães (MENDES et al., 2016).

Devido à severidade da LV no ser humano e à complexidade do cenário epidemiológico, as ações sanitárias direcionadas para esta infecção devem ser rigorosas. Assim, programas de controle são implantados nas áreas endêmicas, objetivando interromper o ciclo de transmissão. Tais programas assumem três pontos principais: detecção e tratamento dos casos humanos, borrifação de inseticidas no domicílio e peridomicílio; e monitoramento de cães domésticos, já que estes são a principal fonte de infecção para os insetos vetores. Portanto, têm havido grandes

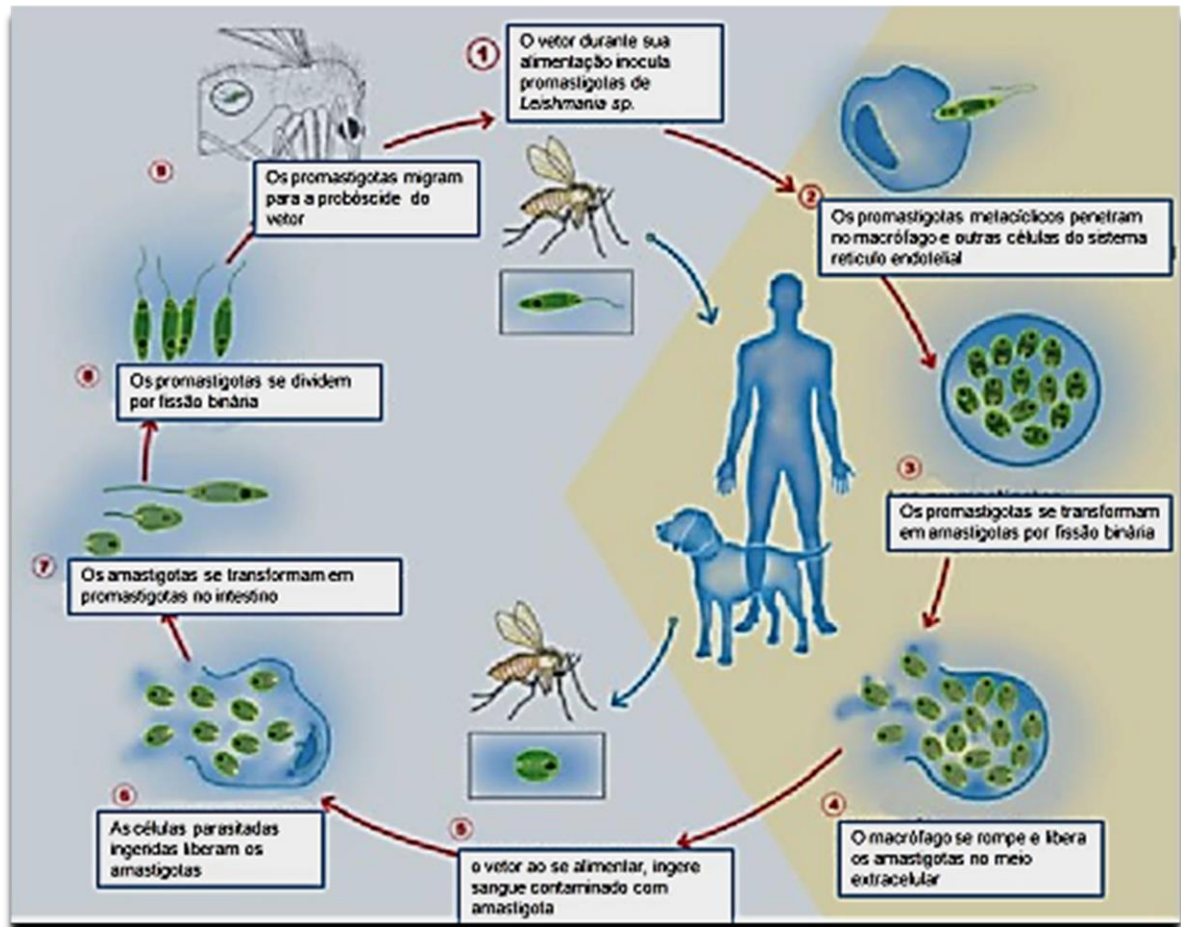
esforços na identificação e eliminação de cães considerados positivos, visando à interrupção do ciclo de transmissão (BRASIL, 2006).

A eutanásia de cães infectados por *L. infantum* é uma das medidas recomendadas pelo Ministério da Saúde do Brasil (MS) para controle da LV (BRASIL, 2006). Contudo, esta prática sozinha não leva ao controle da doença. Segundo Melo e colaboradores (2018) as implicações operacionais e éticas associadas a eutanásia de cães e as dificuldades no controle da doença levam a crer que intervenções que promovam a guarda responsável podem ser uma estratégia mais eficaz.

1.2 Ciclo biológico

O ciclo de vida da *Leishmania* sp. apresenta-se em duas formas diferentes, no hospedeiro vertebrado e invertebrado. O ciclo tem início com a inoculação de formas infectantes do parasito (promastigota metacíclico) durante o repasto sanguíneo da fêmea de flebotomíneo no hospedeiro vertebrado (MONTALVO et al., 2012). Existem ainda registros de transmissões acidentais por transfusões sanguíneas (DANTAS-TORRES, 2006). Quando chegam à circulação, as formas promastigotas de *Leishmania* sp. utilizam de mecanismos próprios para escapar à lise celular, ativada pelo sistema complemento. Portanto, o protozoário *Leishmania* sp. sobrevive ao ataque do hospedeiro devido a esse mecanismo protetor e ainda consegue acometer macrófagos através da manipulação de receptores celulares (CAMPOS-PONCE et al., 2005). O ataque de macrófagos é uma estratégia essencial para a sobrevivência da *Leishmania*. Neles há proteção a resposta imune do hospedeiro. As formas promastigotas fagocitadas pelos macrófagos se transformam em formas amastigotas, dentro de um vacúolo parasitóforo (fagossomo) e se multiplicam por divisão binária, levando ao rompimento do macrófago parasitado. Após haver o rompimento celular as formas amastigotas são novamente liberadas e fagocitadas por novos macrófagos. Quando o vetor realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, ingere macrófagos parasitados pela forma amastigota de *Leishmania* sp. Já no tubo digestivo do vetor, as formas amastigotas transformam-se novamente em promastigotas, completando o ciclo, como representado pela figura 2.

FIGURA 2: Ciclo de transmissão da leishmaniose. Fonte: Adaptado de MONTALVO et al., (2012).



1.3 Diagnóstico da infecção por *Leishmania infantum* em cães

No diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães deve ser considerada a associação entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. Os testes laboratoriais contam com ferramentas de diferentes complexidades, cuja aplicabilidade pode variar de acordo com os profissionais técnicos envolvidos e a infraestrutura do local. As técnicas mais utilizadas para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães são: testes sorológicos, métodos parasitológicos, métodos histopatológicos e a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de DNA do parasito (GRIMALDI et al., 2012).

1.3.1 Diagnóstico sorológico

Os testes sorológicos para diagnóstico da infecção por *L. infantum* são baseados em detecção de anticorpos séricos específicos desse parasito. Em áreas endêmicas de LV, os testes sorológicos são usados como ferramenta nos inquéritos epidemiológicos para diagnóstico e posterior recolhimento dos cães positivos (BRASIL, 2006). Diferentes antígenos e tecnologias vêm sendo testados com resultados promissores para utilização no diagnóstico da LV em cães, porém há necessidade de validação dos novos métodos (FARIA; ANDRADE, 2012).

A técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ou ensaio de imunoabsorção enzimática é um teste imunoenzimático que tem como princípio a imobilização de um antígeno em fase sólida ou ligante, que com a adição de uma anti-imunoglobulina conjugada a peroxidase e de uma amostra clínica contendo anticorpo específico, leva à formação de imunocomplexo revelada pela adição de substrato da enzima e cromógeno. O resultado é expresso pela absorbância obtida por espectrofotometria (CAVALCANTI et al., 2008). Por ser de simples execução e apresentar resultados objetivos, é indicada para uso em larga escala, como em inquéritos epidemiológicos. O sororreagente considerado é aquele que a titulação seja igual ou superior à diluição de 1:40 (BRASIL, 2014). Estudos de acurácia da técnica para diagnóstico de LV em cães mostraram resultados bastante divergentes.

A sensibilidade da técnica de ELISA variou de 8% a 100% e a especificidade de 60% a 100% (PEIXOTO et al., 2015).

O teste rápido DPP® Leishmaniose Canina produzido por Bio-Manguinhos é um teste qualitativo de imunocromatografia, que utiliza uma matriz de membrana de nitrocelulose ligada a uma tira de acetato transparente. Nessa tira, se ligam o antígeno específico, o anticorpo presente na amostra e um anticorpo anti-imunoglobulina marcado para revelar a reação que pode ser lida de forma visual ou eletrônica. Esse teste utiliza como antígeno a proteína recombinante K28 (fragmentos K26, K39 e K9), que contém sequência de aminoácidos altamente conservada entre as espécies viscerotrópicas de *Leishmania* (CAVALCANTI et al., 2008; FUNED, 2013). A técnica de DPP® utilizando antígenos recombinantes trouxe mais especificidade ao diagnóstico sorológico da LV em cães. No entanto, a sensibilidade dessa técnica, principalmente na identificação de cães assintomáticos, é discutida (DA SILVA et al.,

2014). Em uma avaliação publicada por Schubach et al. (2014), a técnica de DPP® não apresentou especificidade satisfatória. Este resultado pode ser consequência da escolha de testes parasitológicos aplicados a amostras de pele como padrão de referência. Uma baixa carga de *L. infantum* em amostras de pele pode ter influenciado negativamente os resultados do padrão de referência e, conseqüentemente, as conclusões sobre a acurácia da técnica de DPP® avaliada.

A especificidade dos testes sorológicos para diagnóstico da LV em cães é uma preocupação, pois os resultados falso-positivos podem levar a eutanásia de cães não infectados. A especificidade dos testes é especialmente importante em áreas onde há circulação de diferentes espécies de *Leishmania* e de outros micro-organismos que frequentemente infectam cães e podem confundir o diagnóstico sorológico. Diversos agentes infecciosos já foram descritos como responsáveis por reação sorológica cruzada em testes para pesquisa de LV em cães: *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma caninum*, *T. cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (ZANETTE et al., 2014). Por outro lado, resultados falso-negativos podem ocorrer por atraso no período pré-patente ou pelo fato de alguns cães nunca soroconverterem (PARANHOS-SILVA et al., 1996).

O protocolo recomendado pelo Ministério da Saúde (MS) até o ano de 2011 em inquéritos sorológicos em áreas endêmicas pelo Brasil consistia em triagem por ELISA e confirmação do diagnóstico através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) em eluato de sangue em papel filtro ou soro. Estudos demonstraram que este protocolo não apresentava sensibilidade (FIGUEIREDO et al., 2010a, 2010b) e especificidade (MADEIRA et al., 2006; SILVA et al., 2011) adequadas. E um estudo de acurácia encomendado pelo MS, o DPP® apresentou sensibilidade de 91% e especificidade de 70,2% (BRASIL, 2011b). E após avaliação de diferentes técnicas sorológicas, o MS alterou o protocolo utilizado em inquéritos de LVC para associação entre os métodos DPP® como triagem e ELISA como teste confirmatório, cenário que apresentou não só boa acurácia, como maior praticidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011a). O DPP LVC e ELISA como métodos sorológicos de diagnósticos se mostraram capazes de diferenciar cães infectados de cães saudáveis e vacinados (CAMPOS et al., 2017a).

1.3.2 Diagnóstico Parasitológico

Os métodos parasitológicos incluem: exame microscópico direto por citopatologia e isolamento do parasita em meio de cultura a partir de diferentes espécimes clínicos (GONTIJO E MELO, 2004). Além disso, outras técnicas como a histopatologia e imuno-histoquímica são muito utilizadas pela sua sensibilidade alta. Os espécimes clínicos coletados para o diagnóstico parasitológico dos cães suspeitos de LV podem ser obtidos a partir de aspirado de medula óssea, baço, fígado, linfonodos e, em alguns casos, de fragmentos de pele íntegra, pele com lesão ou vísceras obtidos a partir de necropsia (GONTIJO E MELO, 2004; BRASIL, 2006).

Entretanto, alguns dos procedimentos citados para obtenção de material são invasivos, podendo gerar riscos para o animal, além de serem impraticáveis em programas de saúde pública, nos quais um grande número de animais deve ser avaliado num período curto (BRASIL, 2006b).

Na técnica de cultura parasitológica (CP), amostras de tecido do hospedeiro podem ser cultivadas em meio bifásico em uma estufa a temperatura de 25 a 28° C para isolamento de formas promastigotas do parasito (EVANS, 1989). O cultivo *in vitro* de *Leishmania* sp., combinado à caracterização isoenzimática da espécie por eletroforese, é um método 100% específico, com sensibilidade variando de 78,7% a 80,3% considerado padrão de referência no diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães (MADEIRA et al., 2006; BRASIL, 2006). Esse método, também é indicado para identificação e monitoramento da espécie de *Leishmania* circulante em uma área endêmica (ALMEIDA et al., 2011). Entretanto, esse método não é aplicado em estudos epidemiológicos principalmente por ser laborioso e requerer longo período de espera até a obtenção de resultados. Além disso, é uma técnica suscetível à contaminação microbiológica e que pode ser de difícil realização devido a difícil adaptação de algumas espécies ao meio de cultura (MAIA E CAMPINO et al., 2008).

Por sua vez, a análise histopatológica dos fragmentos de tecido coletados por biópsia também é de fundamental importância no diagnóstico das leishmanioses, pois permite a identificação das formas amastigotas nos tecidos e, concomitantemente, contribui para o diagnóstico diferencial (MARQUES et al., 2004). A histopatologia é uma técnica que permite não só a detecção do parasito como a associação deste com lesão tecidual. Nessa técnica, cortes histológicos são corados por hematoxilina-eosina (H.E) para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp. no interior de vacúolos

parasitóforos de macrófagos. A técnica requer expertise do examinador, podendo ser laboriosa e inconclusiva, principalmente em casos com baixa carga parasitária (XAVIER et al., 2006). A fixação das amostras em formalina tamponada neutra a 10% e o seu armazenamento de amostras em blocos de parafina permite a análise do material muitos anos após a coleta, não havendo a preocupação com contaminação microbiológica como na prática de CP.

A imuno-histoquímica (IHQ) é uma técnica que se baseia na detecção de antígenos em cortes histológicos por uso de anticorpos específicos acoplados a uma enzima. Esta converte o substrato incolor em substância colorida que se precipita à formação de imunocomplexo e a reação pode então ser visualizada ao microscópio óptico. O sinal da reação pode ser intensificado pelo uso de um anticorpo secundário anti-imunoglobulina ligado à enzima, sendo este método chamado indireto (ABBAS et al., 2008). Para diagnóstico de LV em cães pode-se utilizar como anticorpo primário um anticorpo monoclonal ou policlonal anti-*Leishmania* ou, mais comumente, o soro hiperimune de um animal infectado (XAVIER et al., 2006). A desvantagem de utilizar soro de cão naturalmente infectado está relacionada à falta de padronização da obtenção de anticorpos e a maior chance de ocorrer reações cruzadas, já que o soro é obtido da mesma espécie que a amostra investigada. No Serviço de Anatomia Patológica (SEAP), a IHQ é rotineiramente realizada segundo o protocolo descrito por Quintella et al. (2009), que utiliza soro hiperimune de coelho como anticorpo primário. A IHQ confere maior sensibilidade ao diagnóstico quando comparada à histopatologia convencional por H.E na pesquisa de *Leishmania* spp. em tecidos de cães (MENEZES et al., 2013) e humanos (QUINTELLA et al., 2009). Entretanto, a HE e IHQ apresentam uma menor sensibilidade do que as técnicas sorológicas e PCR e não permitem a identificação de *Leishmania* em nível de espécie (QUEIROZ et al., 2011).

De modo geral, a baixa sensibilidade do exame microscópico direto de aspirados de medula óssea, a ineficiência de testes sorológicos na diferenciação de casos ativos e de cura, e o fato do isolamento de *Leishmania* spp. em cultura ser um método trabalhoso, com baixa sensibilidade suscetível a contaminação compõem um panorama adverso ao diagnóstico laboratorial da LV em cães.

1.3.3. Melhores sítios de coleta de amostras biológicas para diagnóstico de LV em cães

O uso da cultura parasitológica como técnica padrão de referência no diagnóstico de infecção por *L. infantum* em cães é discutido, já que a sensibilidade da técnica pode ser prejudicada por contaminação microbiológica ou por fraca adaptação do parasito ao meio de cultura, subestimando assim a especificidade de outros métodos avaliados. Além de exigir uma estrutura laboratorial adequada e envolver um procedimento do qual é necessário um profissional habilitado e treinado

Outro ponto importante a ser discutido na determinação de um padrão de referência é o tipo de tecido a ser utilizado para confirmação da infecção por *L. infantum*. Os achados sobre o tecido de escolha para detecção de *L. infantum* são divergentes. Alguns pesquisadores não encontraram diferença significativa quando compararam tecidos para isolamento do parasito (MANNA et al., 2004). Outros sugerem o linfonodo (MADEIRA et al., 2006; MELLO et al., 2014; FURTADO et al., 2015) ou baço (SOLCÀ et al., 2014) ou a pele como um bom sítio para isolamento de *L. infantum* (MADEIRA et al., 2009). As divergências encontradas entre os estudos se devem, em parte, às metodologias utilizadas, incluindo diferentes sítios avaliados e diferentes técnicas de diagnóstico aplicadas.

Apesar do linfonodo e o baço serem considerados bons tecidos para o diagnóstico de infecção por *L. infantum*, a obtenção de uma amostra de linfonodo é considerada mais prática e segura do que as obtidas a partir de uma amostra de baço.

Alguns profissionais evitam a amostragem de baço de animais vivos devido ao seu risco de invasão e hemorragia, mas alguns pesquisadores (BARROUIN-MELO et al., 2004) avaliaram a segurança de punções de baço em cães sintomáticos e assintomáticos e concluíram que esse procedimento é eficaz e seguro para o diagnóstico de *L. infantum* em cães. A pele é um bom tecido para diagnóstico da *L. infantum* apenas em cães sintomáticos. Embora a pele seja considerada um bom alvo para detectar *L. infantum* em cães (MADEIRA et al., 2009) ela não deve ser usada em testes padrão de referência quando a população inclui cães assintomáticos. Os cães soropositivos assintomáticos apresentaram alta frequência de infecção ativa por *L. infantum* em baço e linfonodo, mas uma frequência significativamente menor em pele (MELLO et al., 2014; FURTADO et al., 2015).

1.3.4. Sensibilidades das diferentes técnicas de diagnóstico no linfonodo de cães para detecção de *L. infantum*.

O diagnóstico da LVC é complexo e um fator importante que ajudaria neste contexto é a determinação de um tecido de escolha juntamente com a técnica para o diagnóstico. A pele, baço, linfonodo e medula óssea são os tecidos mais comumente coletados para a detecção de *L. infantum* em cães, mas os resultados quanto à sua sensibilidade e especificidade para confirmar a infecção em cães são divergentes (BRASIL, 2006).

O linfonodo tem estado presente na maioria das pesquisas que envolvem o diagnóstico da doença e segundo alguns autores apresentam os bons resultados na identificação do parasito (MELLO et al., 2014; FURTADO et al., 2015; GUERRA et al., 2019). Em um estudo conduzido por Furtado et al. (2011) foram utilizados 32 cães entre machos e fêmeas para analisar materiais obtidos por linfonodos, medula óssea, baço, sangue periférico e pele, de animais sorologicamente positivos para os testes de ELISA® e RIFI, sendo observada a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. Em punção de medula óssea - crista ílíaca (50%), punção de medula óssea-tíbio-femural (46,87%), punção de baço (40,62%), punção de linfonodo pré-escapular (37,5%), punção de linfonodo poplíteo (37,5%) e “imprint” de ponta de orelha - pele (25%). Foram feitas lâminas para diagnóstico direto corado por GIEMSA em todas as amostras.

Animais positivos para leishmaniose visceral geralmente apresentam linfonodomegalia, e isso ocorre devido à predominância de macrófagos e plasmócitos, envolvendo todas as regiões do linfonodo e causando distorção deste órgão pela presença de granulomas atípicos associados à atrofia linfoide (MOREIRA, 2010). Por esse motivo, a coleta de material é facilitada pelo aumento do tamanho do órgão. Adicionalmente, a localização do linfonodo poplíteo permite fácil identificação, palpação e coleta de amostras de forma pouco invasiva e dolorosa ao cão. As principais técnicas de coleta em linfonodo são punção aspirativa por agulha fina e coleta de fragmento de linfonodo através de necropsia. No exame microscópico direto por citopatologia, a pesquisa de formas amastigotas é realizada em lâminas de

impressão por aposição do material coletado na punção, após coloração pela técnica de Giemsa, Leishman ou Panótico (BRASIL, 2006).

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) dos linfonodos tem sido o exame mais proposto devido a sua facilidade de execução, obtenção de material significativo para o exame e poucos riscos inerentes à técnica, além de apresentar baixa agressividade tecidual (TEIXEIRA et al., 2010).

Apesar do método de PAAF ser de alta especificidade, existem limitações ao seu uso, por ser um método que exige prática do profissional e apresenta dificuldade na punção do material, quando em linfonodos reduzidos, por exemplo. Essas limitações levam o método sorológico ser o mais utilizado pelos profissionais para estudos epidemiológicos que avaliam um número elevado de cães (ZANETTE, 2006).

A coleta de fragmento de linfonodo, não é uma técnica utilizada como rotina para o diagnóstico, já que ocorre a retirada completa do tecido comumente associada a necropsia de animais destinados a eutanásia. Como principal vantagem é a possibilidade de extrair fragmentos para diversas técnicas de diagnóstico e como desvantagens o profissional necessita de um treinamento para realizar a coleta e há possibilidade de contaminação microbiológica em amostras destinadas a cultura parasitológica. Contudo, baseado em trabalhos recentes, a coleta de amostras de linfonodo tem sido realizada na maioria dos trabalhos relacionados a testes diagnósticos em cães com LVC , com obtenção de bons resultados (Quadro 1).

Quadro 1. Sensibilidade do linfonodo frente as técnicas de diagnóstico de *L. infantum* em cães

Métodos de diagnóstico	Tipo de coleta	Tipo de linfonodo	Nº amostras testadas	Frequência de positivos	Referências
Citologia simples/ Diagnostico Direto	Aspirado	Linfonodo poplíteo	50 amostras	32%	GUERRA et al. (2019).
H.E/IHQ	Fragmento	Linfonodo poplíteo	Não informado	39,13% H.E 92,68% IHQ	MAIA et at. (2009).
PCR	Fragmento	Linfonodo	95 amostras	99%	MANA et al. (2014)
H.E / IHQ	Fragmento	Linfonodo	89 amostras.	43,90% H.E 65,85% IHQ	MOREIRA et al. (2007).
Cultura Parasitológica	Fragmento	Linfonodo poplíteo	116 amostras	73,8%	MELLO et al. (2014).
IHQ	Fragmento	Linfonodo poplíteo	65 amostras	70%	FURTADO et al. (2015).

PCR= Reação em cadeia da polimerase, IHQ= Imunohistoquímica e H.E= Hematoxilina –eosina

2 JUSTIFICATIVA

A atual expansão geográfica de LV no Brasil é preocupante não apenas para a medicina veterinária, mas especialmente para a saúde pública, já que o cão doméstico é apontado como principal reservatório do parasito. A ocorrência de novos casos em várias regiões do município e estado do Rio de Janeiro demonstra uma possível alteração no comportamento dessa endemia, possibilitando o surgimento de um surto em áreas urbanas, como já foi relatado em outras cidades brasileiras (BRASIL, 2006).

No ano de 2011, iniciou-se um surto da doença em cães do município de Barra Mansa-RJ, que foi acompanhado de casos de LV em humanos. No mesmo ano, foram relatados casos caninos na região central do município do Rio de Janeiro, especificamente no bairro do Caju. O Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LapClin-Dermzoo), o Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (VigiLeish) e Serviço de Anatomia Patológica (SEAP) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) trabalham no estudo do perfil epidemiológico da doença na população de cães. Este estudo engloba a identificação da espécie de *Leishmania* circulante, avaliação clínica dos cães infectados e o estudo de diferentes técnicas para diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães. Independentemente da discussão sobre a efetividade da eutanásia de cães infectados, a aplicação de eficientes métodos para o diagnóstico da infecção nesses animais é fundamental para o controle da infecção.

Não há uma técnica padrão de referência no diagnóstico da LV em cães, principalmente sem sinais clínicos. Além disso, existe uma extrema dificuldade para coleta de material a campo. Um estudo em 2015 conduzido por Furtado et al. (2015) comparou técnicas de hibridização in situ, imuno-histoquímica e cultura parasitológica para o diagnóstico de infecção de *L. infantum* na pele, baço, linfonodo e medula óssea de cães soropositivos, além de avaliar a frequência de infecção ativa com *L. infantum* nos diferentes tecidos. Esses autores concluíram que a maior porcentagem de cães infectados foi detectada usando amostras de baço e linfonodo.

Com o objetivo de unir uma técnica de coleta e uma amostra tecidual mais eficiente para diagnóstico parasitológico de *L. infantum*, escolhemos o linfonodo poplíteo como tecido para o diagnóstico e utilizamos a agulha semiautomática para

tecidos moles cuja utilização já está bem estabelecida na medicina humana. Na medicina veterinária, o uso dessa ferramenta de coleta ainda é escasso, mas, mostrou bons resultados para coleta de amostra de fígado em ovinos obtendo amostras uniformes e de qualidade para o diagnóstico histopatológico (NÉSPOLI et al., 2010).

O uso da agulha semiautomática para tecidos moles se mostrou eficiente e versátil na coleta de amostras, proporcionando uma maior quantidade de amostra, menos invasiva e com capacidade de coleta a campo. Sendo assim em uma única coleta/disparo é possível extrair amostras para diagnóstico parasitológico, histopatológico e molecular. Como se trata de uma ferramenta pouco utilizada em Medicina Veterinária foi preciso estabelecer um calibre padrão, já que existem em diversos tamanhos, que fosse possível coletar amostras de cães de pequeno e grande porte.

Entretanto, ainda há a necessidade de mais estudos para avaliação dessa ferramenta em cães e outros animais.

As razões para o uso de linfonodos em vez de baço ou medula óssea para o diagnóstico de LVC é a localização mais periférica dos linfonodos e preocupações com a segurança dos procedimentos, ou seja, um possível risco de hemorragia interna após uma punção de baço ou fígado. No entanto, até o momento nenhum estudo avaliou comparativamente as vantagens e limitações do linfonodo em relação as coletas de órgãos internos no diagnóstico da LVC. Os principais riscos que podem ser previstos para esses procedimentos são hemorragia do baço e lesão do plexo neurovascular poplíteo.

Diversos métodos de diagnóstico vêm sendo desenvolvidos com resultados promissores, porém há necessidade de estudos de validação para que os novos testes sejam implementados na rotina clínica e em inquéritos epidemiológicos. Para validação de testes é indispensável estabelecer um padrão de referência confiável e esse é um dos maiores desafios nas pesquisas de diagnóstico de LVC. Desafio que não se restringe apenas à determinação de uma técnica laboratorial, mas também de um tecido e do método a ser utilizado para confirmar a infecção por *L. infantum*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliação de agulha semiautomática para coleta de amostras de linfonodo para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães.

3.2 Objetivos específicos

1. Comparar a frequência de positividade para *Leishmania* sp. no linfonodo poplíteo de cães soropositivos para esse parasito entre as técnicas de cultura parasitológica em amostras coletadas por punção com agulha semi-automática, punção aspirativa por agulha fina e necropsia e as técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica em amostras de linfonodo poplíteo coletadas por necropsia.
2. Avaliar os sinais clínicos presentes nos animais estudados.
3. Comparar o tempo para isolamento de *L. infantum* em cultura parasitológica a partir de amostras de linfonodo poplíteo coletadas por punção com agulha semi-automática, punção aspirativa e necropsia.
4. Comparar a frequência de resultados negativos na detecção de formas promastigotas de *L. infantum* por contaminação microbiológica na cultura parasitológica entre as amostras de linfonodo poplíteo coletadas por punção com agulha semi-automática, punção aspirativa por agulha fina e necropsia.

4. METODOLOGIA

4.1. Desenho do estudo e população alvo

O presente estudo trata-se de uma avaliação de método, com um desenho seccional, composto por uma amostra de conveniência baseada no número de animais atendidos/recebidos por ano no setor e estimada em 30 cães, provenientes de uma área endêmica para leishmaniose visceral canina e com o diagnóstico confirmado por técnicas sorológicas preconizadas pelo MS.

Os cães incluídos neste estudo foram provenientes do município de Barra Mansa, no estado do Rio de Janeiro, e examinados em inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose canina realizado pela Secretaria Municipal de Saúde desse município. Todos os cães incluídos apresentaram resultados sorológicos positivos nos testes de DPP® e ELISA, que detectam anticorpos anti-*Leishmania* e por isso foram encaminhados para eutanásia de acordo com recomendações do MS para controle da LV (BRASIL, 2006).

As técnicas laboratoriais empregadas foram a cultura parasitológica, a histologia utilizando a hematoxilina-eosina e a imuno-histoquímica.

4.2 Critérios de elegibilidade

4.2.1. Critérios de inclusão

1. Cães com resultado positivo nos testes de DPP® e ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*, residentes no município de Barra Mansa – RJ.
2. Cães com idade superior a 8 meses.
3. Cães cujos tutores aceitaram que seus animais fossem retirados, medida preconizada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006).

4.2.2 Critérios de exclusão

1. Cadelas prenhas.
2. Cães agressivos.

4.3. Materiais, Procedimentos e Técnicas

4.3.1. Manejo dos animais

4.3.1.1 Recepção, Contenção e Avaliação clínica

Os cães soropositivos foram transportados da cidade de Barra Mansa - RJ para o LAPCLIN-DERMZOO - INI-FIOCRUZ, de acordo com as normas e procedimentos padrão adotados para retirada dessa categoria de animal, conforme o Manual de Controle de Leishmaniose Visceral (BRASIL, 2006). O transporte foi de responsabilidade do Serviço de Vigilância Ambiental do município e realizado por um veículo tipo “pick up” através de caixas de transporte, abrigando os animais separadamente, de acordo com o porte os quais foram acompanhados e avaliados pelos agentes de zoonoses treinados. Os tutores foram orientados a deixar seus animais em jejum, de no mínimo 8 horas.

Com a chegada dos cães e os responsáveis pelo município, antes de qualquer procedimento seja ele, exame clínico ou coleta de material biológico, foram verificadas todas as fichas, documentos e laudos técnicos relacionados a cada animal. Enquanto isso, o animal tinha um período de descanso e espera até o início dos procedimentos e manejo.

Os cães foram recebidos por dois veterinários, devidamente paramentados com jaleco, luva de procedimento e máscara, os quais foram responsáveis por iniciar a contenção manual dos animais, a qual foi realizada (com auxílio de focinheira adequada para o porte do animal) como se segue: um dos braços do veterinário foi

posicionado sob o pescoço do animal, prendendo-o moderadamente com o antebraço, enquanto que o outro braço, sobre o abdômen do animal, segurou o membro anterior que se encontra do mesmo lado de quem executa a contenção. Foi realizado exame físico constituído de inspeção de pele e de mucosas oral e ocular, palpação de linfonodos superficiais e órgãos abdominais. As informações foram anotadas em uma ficha (anexo B) contendo a identificação, sinais clínicos apresentados e os dados do animal e tutor.

Os cães foram examinados individualmente e agrupados de acordo com o comprometimento clínico. Dessa forma, os cães foram classificados em cães com e sem sinais clínicos. Os sinais clínicos compatíveis e que foram levados em consideração na classificação foram: onicogribose, hepatoesplenomegalia., linfadenomegalia e descamação furfurácea.

4.3.1.2 Coleta de espécimes clínicos para o diagnóstico

a) Sedação

Com animal devidamente contido, o outro veterinário realizou administração dos fármacos, cloridrato de quetamina 10% (10 mg/kg) associada a acepromazina 1% (0,2 mg/kg) na mesma seringa via intramuscular profunda, no membro pélvico entre a musculatura do semimembranoso e semitendinoso, utilizando-se agulha 0,70x25mm (22G) e seringa de 5mL.

b) Eutanásia

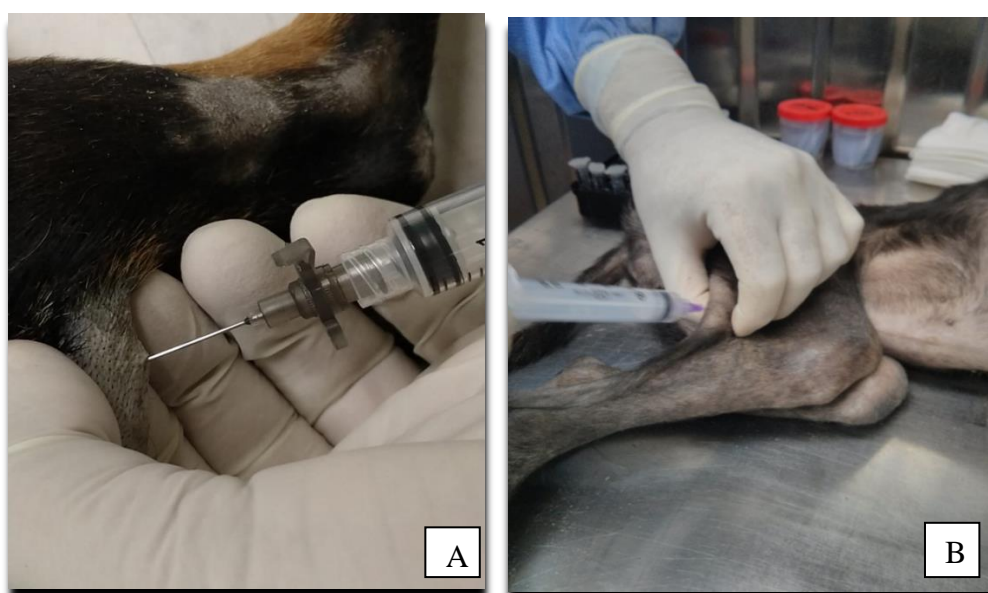
Com os cães devidamente sedados e após antissepsia local com álcool 70%, foi administrado tiopental sódico THIOPENTAX® a 0,5g (10-25mg/kg) via IV (veia cefálica), através de infusão lenta (dose efeito), em uma dose 3 vezes a indicada para o plano anestésico, utilizando escalpe “BD Vacutainer” estéril 25G. Esse anestésico foi aplicado até o animal alcançar o estado de inconsciência, além de ausência de

reflexo palpebral e digital e rotação de globo ocular. Em seguida, foi administrado o cloreto de potássio 19,1% (1mg/kg) via IV, com auxílio do mesmo escalpe utilizado na administração do tiopental. O óbito foi confirmado pela ausência de batimentos cardíacos, pulso e movimentos respiratórios, com auxílio de estetoscópio.

c) Punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de linfonodo poplíteo.

Foi selecionado o linfonodo poplíteo que apresentou o maior tamanho a palpação e manipulado até que estivesse firme e em destaque sob a pele. Em seguida, após tricotomia e antissepsia com gaze embebidas em clorexidina a 2%, iodopovidona 10% e álcool 70%, nesta mesma ordem e em repetições de pelo menos três vezes cada, utilizando uma seringa de 5 mL com agulha 0.7x25mm, foi realizada uma punção aspirativa no local (Figura 3 A-B). O material obtido, cerca de duas gotas (0,1ml), foi armazenado em tubos de polipropileno de 1,5 ml contendo solução salina estéril acrescida de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e antifúngico (fluorocitocina), na tentativa do isolamento em cultura.

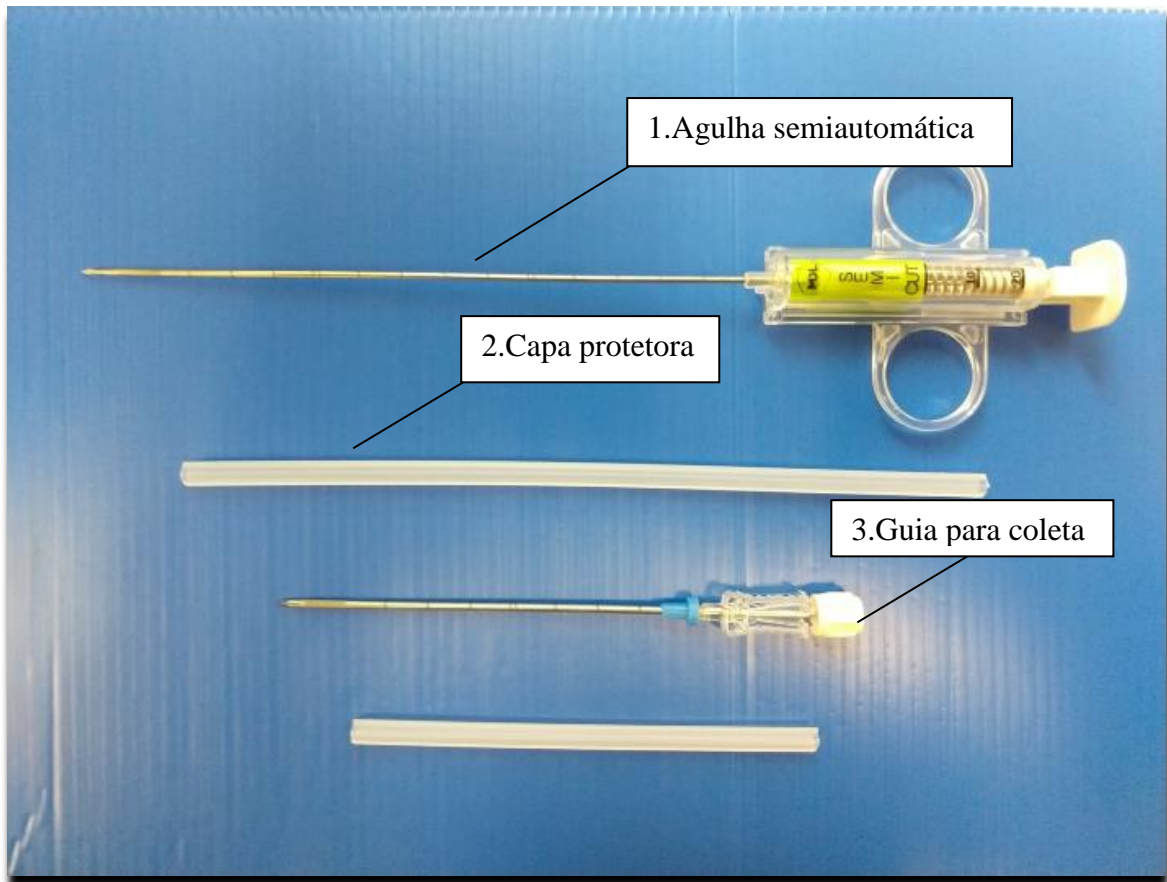
Figura 3 A-B. Técnica de PAAF utilizada na punção do linfonodo poplíteo do animal.



d) Punção de linfonodo por agulha semiautomática para tecidos moles (PASA).

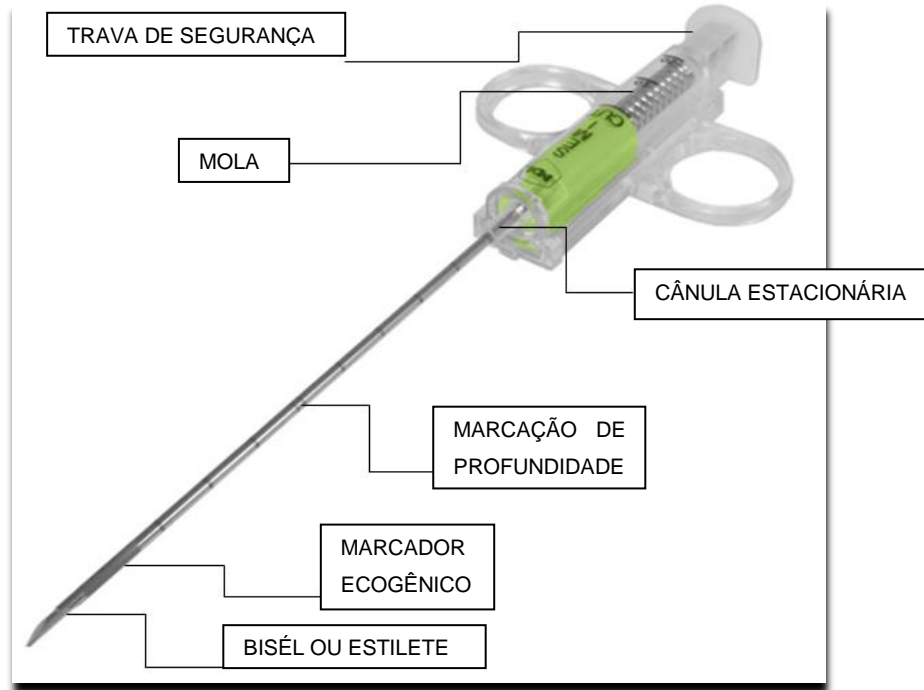
A agulha semiautomática para tecidos mole (ASTM) utilizada, o esquema de coleta, bem como os procedimentos realizados para coleta de amostra de linfonodo poplíteo são mostrados nas figuras 4, 5, 6, 7 e 8 respectivamente. Foi utilizado o mesmo espécime clínico (linfonodo poplíteo) selecionado para a punção aspirativa. Foi realizada novamente a antissepsia como no item anterior e, em seguida, o linfonodo foi manipulado até ficar firme e em destaque sob a pele. Através de uma agulha semiautomática SemiCut, 16 gauge ou 1,3 mm de diâmetro e 15 cm de comprimento, descartável para biópsia de tecidos moles (M.D.L SRL.) o órgão foi perfurado em uma profundidade de cerca de 1 a 2 centímetros dependendo do seu tamanho, sob uma angulação de 45°. A coleta do material foi feita por meio de uma agulha especial acoplada a uma pistola automática de impulsão à mola e por meio de um disparo, o fragmento em forma de fita com cerca de 3 a 5 milímetros de comprimento. Esse fragmento foi armazenado em salina estéril acrescida de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e antifúngico (fluorocitocina) (Figura 8 A-B), na tentativa do isolamento em cultura.

Figura 4: Agulha semiautomática utilizada para a realização de coleta de amostra de linfonodo poplíteo de cães soropositivos para *L. infantum* incluídos no estudo.



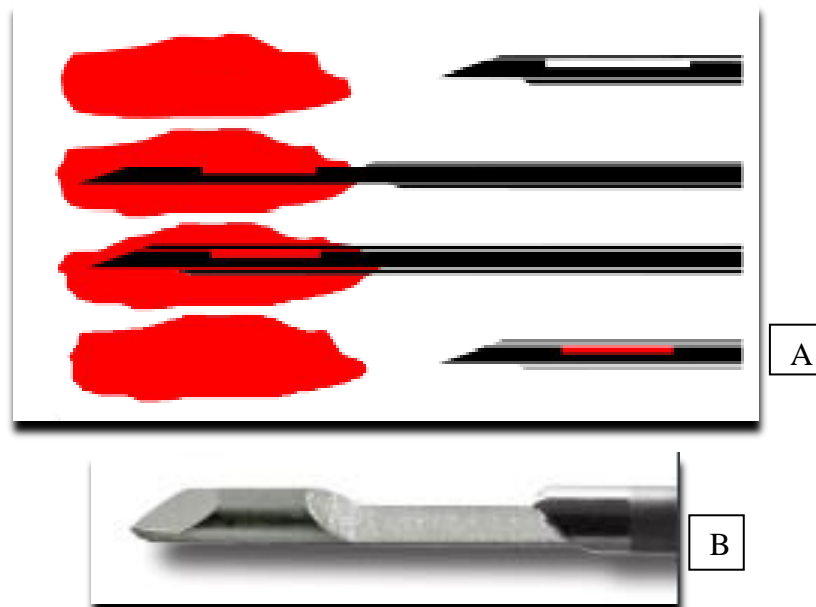
Fonte: Lapclin-Dermzoo INI/FIOCRUZ.

Figura 5: Imagem da agulha semiautomática para coleta em tecidos moles utilizada no estudo.



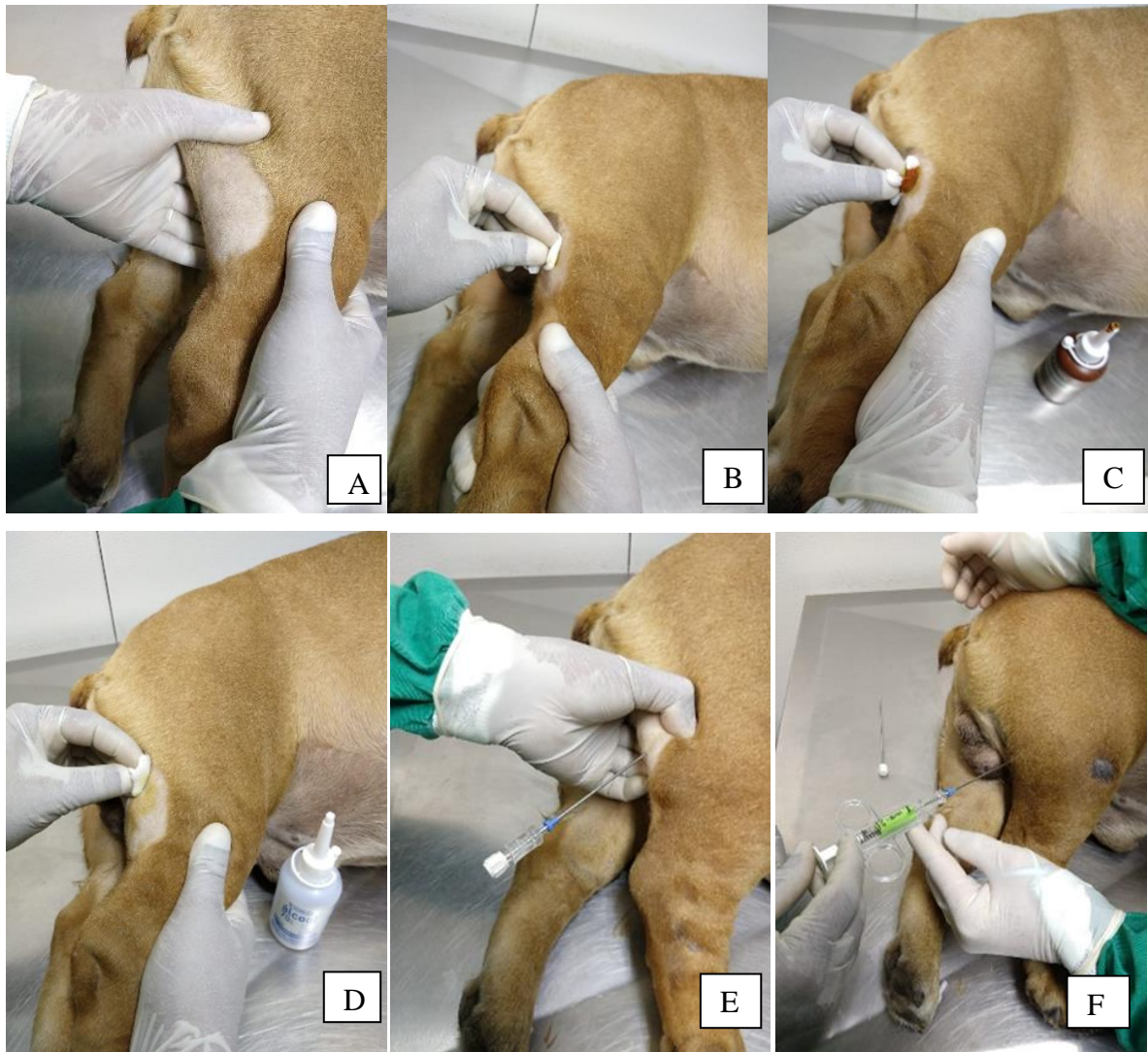
Fonte: Google site MDL.

Figura 6: A. Esquema ilustrando a coleta em tecido utilizando a agulha semiautomática para tecidos moles. **B.** Imagem da cânula de coleta.



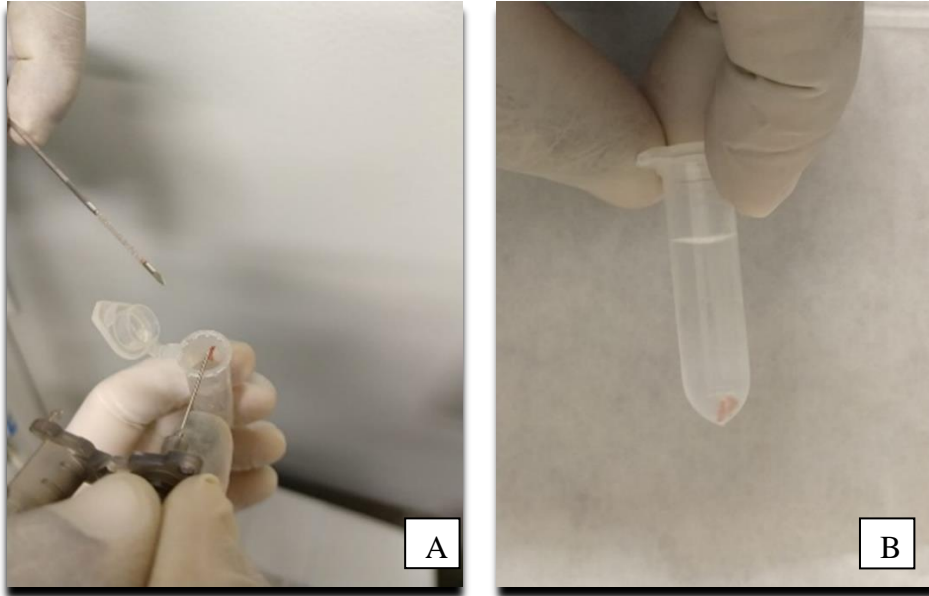
Fonte: Google site MDL.

Figura 7: Esquema para coleta de amostra de linfonodo poplíteo de cão utilizando a agulha semiautomática para tecidos moles. (A) Identificação, tricotomia e posicionamento do linfonodo poplíteo. (B) Limpeza e antissepsia com clorexidina a 2%. (C) Antissepsia utilizando iodopovidona 10%. (D) Antissepsia utilizando álcool a 70%. (E) Fixação da guia para coleta por agulha semiautomática. (F) Agulha introduzida na guia, já fixada no tecido e pronta para a realização da coleta após seu disparo realizado ao apertar o gatilho



Fonte: Lapclin-Dermzoo INI/FIOCRUZ.

Figura 8: Preparo da amostra de linfonodo poplíteo coletada por agulha semiautomática para a cultura parasitológica. (A) Retirada do fragmento do canal da agulha. (B) Fragmento já imerso em solução salina.



Fonte: Lapclin-Dermzoo INI/FIOCRUZ.

e) Coleta de linfonodo na necropsia

Após a coleta utilizando a agulha semiautomática, foi feita a retirada deste mesmo linfonodo. Em seguida, esse linfonodo foi colocado em uma bandeja de aço inox estéril para realização das coletas. Dois fragmentos, próximos do local de coleta por agulha semiautomática, foram coletados utilizando pinça hemostática e bisturi (Figura 9 A-B). Um fragmento foi fixado em formalina tamponada a 10% para realização de histopatologia e imuno-histoquímica. O outro fragmento foi armazenado em solução salina estéril acrescida de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e antifúngico (fluorocitocina), na tentativa do isolamento em cultura.

Figura 9 A-B. Preparo da amostra de linfonodo poplíteo coletada na necropsia, após a extração do órgão em bandeja de inox para a cultura parasitológica, histopatologia e imuno-histoquímica. (A) Corte realizado transversalmente no linfonodo para dividi-lo em dois fragmentos: um para cultura parasitológica e o outro para histopatologia e imuno-histoquímica (B). Figura aumentada do linfonodo poplíteo.



Fonte: Lapclin-Dermzoo INI/FIOCRUZ.

4.4 Histopatologia

4.4.1 Hematoxilina-eosina

Os fragmentos de linfonodo foram acondicionados em tubos de polipropileno com volume de 1,5 mL, contendo formalina tamponada a 10%. Esses fragmentos foram desidratados e emblocados em parafina. Cortes histológicos de 5 μ m obtidos dos blocos de parafina foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para posterior observação em microscópio óptico. O diagnóstico definitivo foi realizado pela visualização de formas amastigotas de *Leishmania* spp. As formas amastigotas possuem formato ovalado ou arredondado, contendo um núcleo e um cinetoplasto, podendo ser isualizadas no interior de macrófagos ou livres. Na histopatologia (HP), o núcleo e o cinetoplasto se coram de azul escuro e o citoplasma é fracamente

eosinofílico (GENARO, 1995). O exame das lâminas foi realizado em microscópio óptico em grande aumento (1000 X).

4.4.2 Imuno-histoquímica

Os cortes histológicos de 5µm obtidos dos blocos de parafina foram colocados em lâminas silanizadas. No primeiro dia, foi realizada inicialmente a desparafinização das lâminas a 60°C por 10 minutos, tendo sido mergulhadas em xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Em seguida, foram lavadas em água corrente por pelo menos 5 minutos. Na etapa seguinte, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena dos cortes histológicos. Para esse fim, foi preparada a solução de bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se 55 mL de álcool metílico P.A. (padrão absoluto) para 45 mL de peróxido de hidrogênio 30% por 40 min a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Para cada 25 lâminas utilizamos um volume de 200 mL da solução.

A próxima etapa realizada foi a de recuperação antigênica, na qual as lâminas com os cortes foram inseridas em cubas preenchidas com tampão citrato (pH=6). As cubas com as lâminas foram incubadas a 65°C por 30 minutos em banho-maria. Após o esfriamento total das lâminas, foi realizada a lavagem por 5 a 10 minutos na água corrente e utilizada uma caneta hidrofóbica para contornar os cortes histológicos. Foi instilada nos cortes uma solução bloqueadora de proteínas Lab Vision™ Ultra V Block (Thermo Scientific, California, EUA) a temperatura ambiente, deixando-a agir por 10 minutos. A seguir, foi aplicada sobre as lâminas a solução tampão TBS (TBS - Tris-Buffered-Saline, TBS IHC Wash Buffer with Tween 20, Cell Marque, Rocklin, California, EUA), deixando-as em repouso por 5 minutos. Retirou-se o tampão e aplicou-se o soro policlonal anti-*Leishmania* diluído a 1:500 em solução diluidora de anticorpos, deixando as lâminas em câmara úmida na geladeira, entre 2 e 8°C, *overnight*. O soro anti-*Leishmania* foi produzido pelo Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses do INI, Fiocruz, por imunização de coelhos com formas promastigotas de *L. infantum*, seguindo o protocolo de Quintella et al. (2009).

A reação para detecção de *Leishmania* spp. foi desenvolvida usando o Kit The HiDef Detection™ HRP Polymer System (Cell Marque, Massachusetts, EUA), de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante, conforme descrito a seguir. Após

incubação com anticorpo anti-*Leishmania* os cortes histológicos foram submetidos a duas lavagens de 5 minutos com solução salina tamponada com TRIS.

Em seguida, os cortes histológicos foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente com o amplificador do kit. Após esses 20 minutos, os cortes foram submetidos a duas lavagens de 5 minutos com TBS. Após, as lavagens os cortes histológicos foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente com polímero detector conjugado à peroxidase. Após mais duas lavagens de 5 minutos com TBS, os cortes foram incubados com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, EUA). As formas amastigotas foram marcadas em castanho pela reação do cromógeno DAB com a peroxidase. Após esta etapa, os cortes foram lavados com três banhos em água destilada durante 2 minutos e, logo após, submetidos à contracoloração com hematoxilina de Harris.

Para montagem, as lâminas foram imersas em água destilada durante 1 minuto, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e montadas em meio de montagem entellan (Merck). Cortes histológicos de tecidos intensamente parasitados com formas amastigotas de *Leishmania* foram incubados com soro homólogo não-imune como controle negativo e com soro policlonal de coelho anti-*Leishmania* como controle positivo. A positividade foi considerada pela observação de pelo menos uma estrutura marcada em castanho e morfológicamente compatível com uma amastigota.

4.5 Isolamento parasitário em meio de cultura

Os aspirados e fragmentos de linfonodo, logo após a coleta, foram mergulhados em solução PBS, pH 7,4 acrescidos de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e antifúngico (fluorocitocina) e conservados à temperatura de 4°C por 24 horas. Após tal período, as amostras foram semeadas em meio bifásico NNN, contendo como fase líquida o meio Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino. As culturas foram conservadas em estufa biológica a 25-28°C e examinadas semanalmente durante 30 dias por exames a fresco, buscando evidenciar formas flageladas. Nos casos onde ocorreu o isolamento parasitário, as amostras foram expandidas para produção de massa parasitária para posterior caracterização isoenzimática.

4.5.1 Eletroforese de enzimas (MLEE)

Todos os isolados obtidos, foram armazenados no banco de amostras do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (VigiLeish/INI/Fiocruz) e analisados pela eletroforese de enzimas. Inicialmente, foi feita a expansão parasitária para obtenção de cerca de 10^9 parasito, que posteriormente foi submetida à lavagem em tampão próprio, sob centrifugação 7000 rpm por 10 minutos a 4° C, até a obtenção de um “pellet” de formas promastigotas do parasito. Esse “pellet” foi depositado em botijões de nitrogênio líquido (NL_2) até a realização das corridas eletroforéticas. Foram empregados cinco sistemas enzimáticos: 6PGDH; GPI; NH; G6PDH e PGM, cuja metodologia se baseou em protocolos já definidos por Cupolillo et al., (1994). Amostras de referência de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) foram empregadas em todas as corridas eletroforéticas. Para a corrida eletroforética, foi necessário um gel de agarose 1% (Tipo V) em tampão de acordo com o sistema enzimático utilizado. Esse gel, depois de dissolvido e fundido foi colocado sobre um filme de poliestireno onde a amostra teste foi aplicada. A corrida eletroforética foi feita empregando-se uma cuba de eletroforese horizontal, devidamente acoplada a um banho maria, com circulação para manter a refrigeração em torno de 4° C. A revelação da atividade enzimática das amostras foi feita colocando diretamente sobre o gel uma mistura contendo os substratos, transportadores e receptores de elétrons, cofatores e tampões próprios para cada enzima, baseados em protocolos já descritos na literatura (CUPOLILLO et al., 1994). A reação foi interrompida adicionando-se ácido acético a 5% e a mobilidade eletroforética dos isolados foi comparada com o padrão das amostras de referência.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com auxílio do programa Statistical Package for the Social Science (SPSS) versão 16.0 foi realizada uma análise descritiva dos resultados da avaliação clínica e das técnicas laboratoriais empregadas no diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães. Consideramos a infecção por *L. infantum* confirmada quando detectamos o parasito em, pelo menos, um teste diagnóstico direto (CP, IHQ e H.E). A frequência de positividade da identificação de *Leishmania* nos vários tecidos e técnicas de diagnóstico foram descritivas.

6. RESULTADOS

A população estudada de 30 cães foi composta por 15 machos (50%) e 15 fêmeas (50%). Quanto à raça, 100% eram sem raça definida (SRD).

Nos 30 animais estudados, 26 (86%) apresentavam sinais clínicos compatíveis com LV e 4 (13%) não apresentavam sinais clínicos. Em relação aos sinais clínicos apresentados a seguir, os animais que apresentaram descamação cutânea furfurácea, pêlo opaco, alopecia e úlcera foram enquadrados em um único grupo, descritos como alterações dermatológicas. A frequência de sinais clínicos encontrada estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência de sinais clínicos encontrada no grupo de 30 cães soropositivos para *Leishmania infantum* incluídos no estudo, provenientes do município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, entre 2018 e 2019.

Sinais clínicos	N	%
Esplenomegalia	23	76
Alterações dermatológicas	18	60
Linfoadenomegalia	12	40
Hepatomegalia	11	36
Onicogribose	9	30
Caquexia/Magreza	9	30
Alterações oftálmicas	5	16
Sem sinal	4	13

N= número de cães; %= percentual.

Vinte e nove cães (97%) foram positivos para *Leishmania* spp. no linfonodo em pelo menos uma das técnicas de diagnóstico utilizadas. Apenas um cão apresentou resultado negativo para *Leishmania* spp. em todas as técnicas de diagnóstico desenvolvidas neste estudo, além de não apresentar sinais clínicos compatíveis com a doença. As frequências de positividade para *Leishmania* spp. em amostras de linfonodo poplíteo pela técnica de diagnóstico em função do número de amostras coletadas por cada técnica, utilizada foram de: 71% (64/90) cultura parasitológica, 70% (21/30) imuno-histoquímica, e 30% (10/30) hematoxilina-eosina. Todos os isolados de *Leishmania* spp. obtidos na cultura parasitológica foram caracterizados como *L. infantum* pela técnica de MLEE.

Os resultados das frequências de positividade para *Leishmania* sp. no linfonodo poplíteo utilizando a coleta por punção com agulha semiautomática (PASA) e exame por CP, comparada às coletas por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) e exame por CP e coleta por necropsia (NL) e exame por CP, HE e IHQ encontram-se expressos na tabela 2.

Tabela 2. Frequências de positividade para *Leishmania* spp. no linfonodo poplíteo de cães soropositivos para esse parasito utilizando a coleta por punção com agulha semiautomática (PASA) e exame por CP, comparada às coletas por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) e exame por CP e coleta por necropsia (NL) e exame por CP, HE e IHQ. Barra Mansa, Rio de Janeiro, entre 2018 e 2019.

Técnica coleta + exame parasitológico	Frequência de positividade para <i>Leishmania</i> em linfonodo poplíteo (N= 30)	
	N	%
NL+ CP	23	76,7
PAAF +CP	22	73,3
NL+ IHQ	21	70
PASA+CP	19	63,3
NL+HE	10	33

N= número de cães; %= percentual; NL+CP= amostra de linfonodo coletada na necropsia e examinada pela técnica de cultura parasitológica; PAAF+CP= amostra de linfonodo coletada através de punção aspirativa por agulha fina e examinada pela técnica de cultura parasitológica; PASA= amostra de linfonodo coletada por punção usando agulha semiautomática e examinada pela técnica de cultura parasitológica; NL + IHQ= amostra de linfonodo coletada na necropsia e examinada pela técnica de imuno-histoquímica; NL+HE: = amostra de linfonodo coletada na necropsia e examinada pela técnica de histopatologia.

A frequência de positividade para *Leishmania* sp. no linfonodo poplíteo de cães soropositivos para esse parasito em função da presença ou ausência da linfadenomegalia estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Frequência de positividade para *Leishmania* sp. no linfonodo poplíteo de cães soropositivos para esse parasito em função da presença ou ausência da linfadenomegalia utilizando a coleta por punção com agulha semiautomática (PASA), punção aspirativa por agulha fina do linfonodo (PAAF) e por necropsia de linfonodo (NL) na CP. Barra Mansa, Rio de Janeiro, entre 2018 e 2019.

Técnica de coleta	Frequência de positividade para <i>Leishmania</i> sp.	
	Linfadenomegalia	Sem linfadenomegalia
	N=12	N=18
PASA	9 (75%)	10 (56%)
PAAF	9 (75%)	13 (72%)
NL	11 (92%)	12 (67%)

PASA=Punção por agulha semiautomática; PAAF=punção aspirativa por agulha fina; NL= necropsia de linfonodo.

O número de amostras positivas e negativas de linfonodo coletadas pela técnica de coleta de PASA comparadas às outras técnicas de coleta estão descritas nas tabelas 4, 5, 6 e 7.

Tabela 4. Casos positivos e negativos para *L. infantum* pela técnica de coleta PASA comparada a PAAF confirmados pela cultura parasitológica, Barra Mansa, Rio de Janeiro, entre 2018 e 2019.

PASA + CP	PAAF + CP		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	16	3	19
Negativo	6	5	11
Total	22	8	30

PASA= Punção por agulha semiautomática; PAAF=punção aspirativa por agulha fina de linfonodo; CP= cultura parasitológica.

Tabela 5. Casos positivos e negativos para *L. infantum* pela técnica de coleta PASA comparada a NL confirmados pela cultura parasitológica, Barra Mansa, Rio de Janeiro, entre 2018 e 2019.

PASA + CP	NL + CP		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	14	5	19
Negativo	9	2	11
Total	23	7	30

PASA= Punção por agulha semiautomática; NL=Necropsia de linfonodo; CP= cultura parasitológica.

Tabela 6. Casos positivos e negativos para *L. infantum* pela técnica de coleta PASA comparada a NL confirmados pela cultura parasitológica e histopatologia. Barra Mansa, Rio de Janeiro, entre 2018 e 2019.

PASA + CP	NL+ IHQ		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	16	3	19
Negativo	5	6	11
Total	21	9	30

PASA= Punção por agulha semiautomática; NL=Necropsia de linfonodo; IHQ= imunohistoquímica.

Tabela 7. Casos positivos e negativos para *L. infantum* pela técnica de coleta PASA comparada a NL confirmados pela cultura parasitológica e histopatologia. Barra Mansa, Rio de Janeiro, entre 2018 e 2019.

PASA + CP	NL + H.E		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	10	9	19
Negativo	1	10	11
Total	11	19	30

PASA= Punção por agulha semiautomática; NL=Necropsia de linfonodo; H.E= Hematoxilina- eosina

Os resultados deste estudo mostram que não houve uma diferença significativa na frequência de positividade entre as técnicas de coleta em relação a linfadenomegalia.

Figura 10: Corte histológico de linfonodo poplíteo de cão mostrando formas amastigotas de *Leishmania* sp. coradas em castanho (setas) no citoplasma de macrófago. Imuno-histoquímica. Objetiva de 40x.

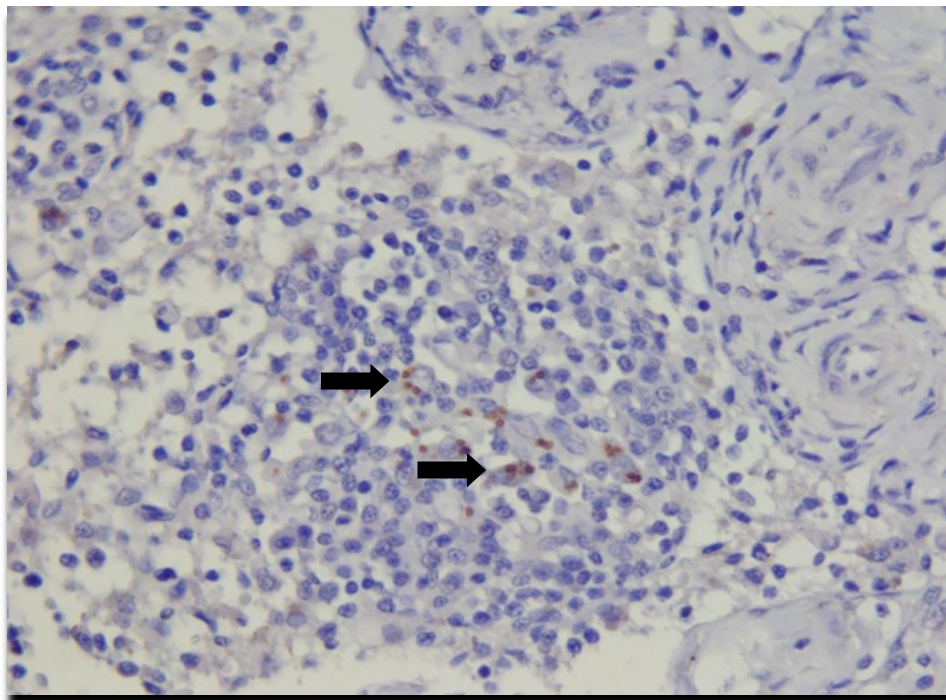
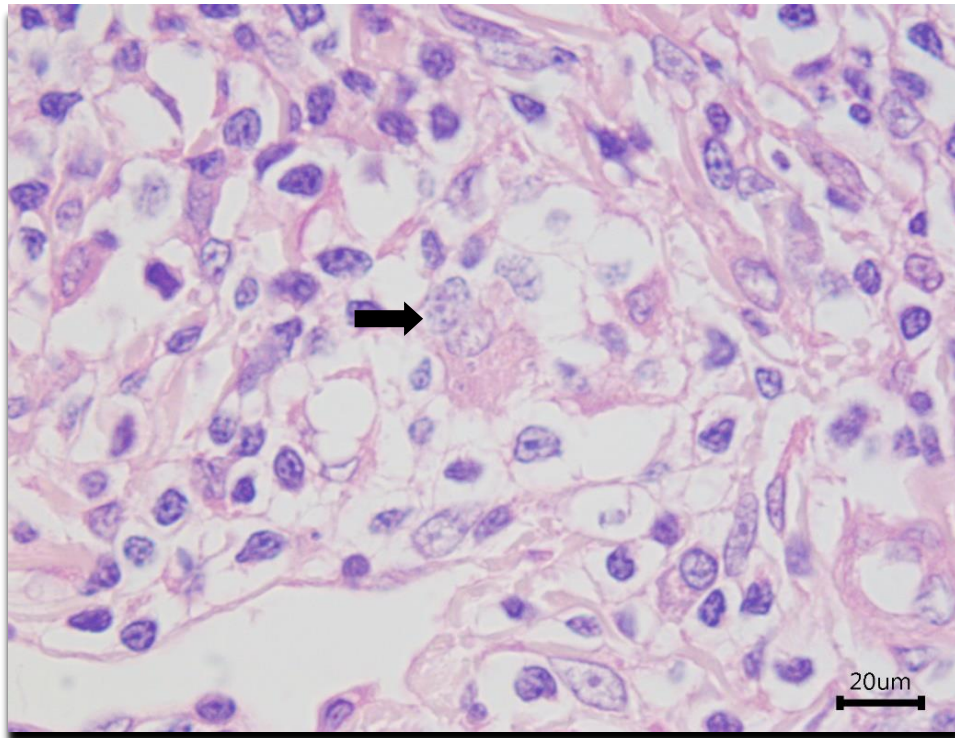


Figura11: Corte histológico de linfonodo poplíteo de cão mostrando formas amastigotas de *Leishmania* sp. (seta) no citoplasma de macrófago. Hematoxilina-eosina.



Com relação ao tempo para a leitura das 64 amostras com resultado positivo para formas promastigotas no diagnóstico da cultura parasitológica em amostras de linfonodos coletadas através de PASA, PAAF e NL, em 87,5% (56/64) o resultado foi obtido na primeira leitura (Tabela 8).

Tabela 8. Frequência de positividade para *Leishmania* sp. em função dos tempos de leitura na cultura parasitológica em amostras de linfonodos poplíteos coletadas por meio das técnicas PASA, PAAF e NL. Barra Mansa, Rio de Janeiro, entre 2018 e 2019.

Técnica de coleta	Frequência de positividade na CP pelo tempo de leitura (N=64)									
	1 ^a		2 ^a		3 ^a		4 ^a		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
PASA	18	95	1	5	0	0	0	0	19	100
NL	20	87	3	13	0	0	0	0	23	100
PAAF	18	82	2	9	1	4,5	1	4,5	22	100

CP=cultura parasitológica. N = número total de amostras positivas na cultura parasitológica considerando todas as técnicas. n=número de amostras positivas na cultura parasitológica por técnica de coleta.

Durante o processo de leitura das 90 amostras de linfonodo coletadas para cultura parasitológica, 4 obtiveram resultado negativo na detecção de formas promastigotas, apresentando contaminação microbiológica por fungo, do qual não atrapalhou o diagnóstico do animal, visto que outras amostras estavam sendo processadas. Das 4 amostras contaminadas, 2 ocorreram na coleta feita por PASA, uma na coleta feita por PAAF e uma na coleta feita por NL, todas as quatro em animais diferentes.

7. DISCUSSÃO

O diagnóstico de uma enfermidade como a leishmaniose visceral canina (LVC) requer o uso de métodos que possam, de maneira segura e confiável, identificar os indivíduos infectados. As técnicas empregadas para este fim devem ser providas de algumas propriedades, tais como: capacidade de detecção da infecção em sua fase inicial, resultados precisos, fácil execução, baixo custo e repetibilidade (BRITO et al., 2009). O diagnóstico efetivo de LVC é extremamente importante tanto no rotina médica veterinária quanto no programa de controle e vigilância da leishmaniose (BRASIL, 2014). E deve ser proporcionado pela combinação de técnicas, uma vez que não há uma única técnica com 100% de sensibilidade e especificidade (BRASIL, 2006).

A cultura parasitológica (CP) é considerada o teste padrão de referência para o diagnóstico da *L. infantum* em cães, detectando esse parasito em 62,1% a 82,2% dos cães soropositivos (Mello et al., 2014). No presente estudo, os resultados de frequência de positividade obtidos pela CP foram superiores aos da imunohistoquímica e histopatologia e semelhantes aos de Mello et al. (2014). Esses resultados demonstram que a CP é uma técnica sensível para a detecção de *L. infantum* em cães. No entanto, consome tempo e pode ser prejudicado por contaminação microbiológica (MELLO et al., 2014). No estudo, em relação a frequência de positividade entre às técnicas de coleta para CP, a que obteve o melhor resultado foi a NL, seguida da PAAF e PASA. Entretanto, a diferença no número de casos positivos detectados por elas foi muito pequena, variando de 1 a 3 casos. As técnicas de coleta por NL e PAAF obtiveram resultados de frequência de positividade muito próximos dos encontrados por Mello et al. (2014) e Furtado et al. (2015) em amostras de NL examinadas pela CP em cães soropositivos. Mello et al. (2014) encontraram uma frequência de positividade de 73,8% e Furtado et al. (2015) observaram 72,3% de positividade. Esses resultados semelhantes também podem estar relacionados ao fato dos cães soropositivos examinados serem da mesma região endêmica do presente estudo. Apesar da PASA ter sido a técnica de coleta com a menor frequência de positividade na CP neste estudo, ela apresentou frequência de positividade superior à de 52,3% como observado por Mello et al. (2014)

para PAAF examinada por CP. Convém ressaltar que PASA e PAAF podem ser utilizadas na coleta *in vivo*. Esses resultados demonstram que a PASA apresenta uma boa taxa de positividade, cuja execução tem potencial para ser realizada *in vivo* e a campo, como PAAF.

Entretanto, a técnica de coleta por PASA chega como uma opção para o diagnóstico da infecção em amostras de linfonodo popliteo principalmente pela boa sensibilidade combinada a cultura parasitológica, a praticidade de coleta e a quantidade maior de amostra coletada comparada à PAAF. Contudo, a PASA necessita de mais estudos para melhor avaliar a técnica quanto a sua invasibilidade para o cão e o grau de lesão que provoca no tecido em estudos a campo, com animais vivos. Deve ser levado em consideração que, como limitação desse estudo, a coleta por PASA foi feita em animais mortos, com isso avaliações como uma possível hemorragia no tecido foi deficitária, além de não terem sido analisados os sinais de dor.

A PAAF de linfonodo com realização de esfregaço do material obtido em lâmina de microscopia para exame citológico é um dos mais utilizados para o diagnóstico da infecção por *Leishmania sp.* em cães pela sua alta especificidade, praticidade, rapidez e baixo custo. No entanto, a sensibilidade dessa técnica é geralmente <50% devido à dificuldade na identificação do parasito, especialmente nos cães que são levemente sintomáticos ou assintomáticos e aqueles com uma carga parasitária baixa, o que pode estar implicado em resultados falso-negativos (MAIA E CAMPINO et al., 2008). Portanto, as técnicas de coleta de PAAF e PASA com realização de cultura parasitológica melhoraram a sensibilidade da técnica de coleta de PAAF com realização da técnica de citopatologia do material obtido, com bom desempenho em cães sem sinais clínicos. Guerra et al. (2019), utilizando a PAAF em linfonodo com a realização da técnica de citobloco de material obtido processada pela técnica de “*cell block*” e imuno-citoquímica (CB-ICC) também obtiveram uma maior sensibilidade do que a PAAF com realização de exame citológico. Esses autores observaram uma sensibilidade da CB-ICC igual a 70%, que foi semelhante às frequências de positividade das técnicas de PASA e PAAF no presente estudo e uma sensibilidade de 32% para PAAF de linfonodo com exame citológico do material obtido. Esses resultados em conjunto demonstram que é possível um refinamento da sensibilidade do diagnóstico parasitológico de *L. infantum* em cães, mantendo a praticidade da coleta da amostra biológica por meio da PASA e PAAF em linfonodos.

Embora sensíveis e 100% específicas, uma das principais desvantagens da cultura parasitológica para o diagnóstico de *L. infantum* em cães é a demora para finalizar o resultado, que tem um tempo médio de 15 dias, mas pode chegar a 30 dias. Ademais, pode ser necessário um tempo longo para obter um número suficiente de parasitos para identificação isoenzimática da espécie de *Leishmania* e usá-los como antígeno para o diagnóstico imunológico, para modelos experimentais da infecção quanto à triagem de medicamentos *in vitro* ou mesmo identificação molecular (MAIA E CAMPINO et al., 2008). Por ser a LVC uma doença de notificação compulsória e de grande importância médica, o tempo que leva entre a coleta da amostra até o resultado faz diferença para que protocolos e medidas de vigilância e controle da doença sejam tomados. As culturas são examinadas semanalmente para a presença de promastigotas. E os parasitos podem ser vistos a partir da 1ª semana, embora repiques semanais possam ser necessários para visualizá-los.

No presente estudo, na grande maioria das amostras de linfonodo positivas na cultura parasitológica, o resultado foi obtido em uma semana (primeira leitura), em uma minoria, entre as 2ª, 3ª e 4ª semanas corroborando com um estudo realizado por Maia et al. (2007). Segundo esses autores, 77,1% das culturas de amostras de baço, linfonodo e medula ossea coletadas em fragmentos de necropsia (“post-mortem”) tornaram-se positivas na 1ª semana e 23%, reforçando a necessidade de repiques a menos até a 3ª semana. Em geral, uma cultura é considerada negativa, após quatro leituras negativas. Com base nos resultados de rapidez do diagnóstico de *Leishmania* sp. em cães por cultura, as amostras de linfonodo e as técnicas de PASA, PAAF e NL demonstraram um excelente desempenho. Já que o que precisamos são técnicas em que consigamos resultados mais rápidos e precisos, para que medidas de prevenção e controle possam ser tomadas mais rápido.

Além do tempo para o diagnóstico, a cultura parasitológica apresenta outros fatores limitantes como a carga parasitaria, dificuldades técnicas ou operacionais que possam interferir na obtenção do material, estrutura laboratorial envolvida e cuidados para se realizar a coleta de maneira mais asséptica possível a fim de evitar uma contaminação microbiológica, que podem impedir o crescimento de formas promastigotas no meio de cultura, prejudicando o diagnóstico (MAIA E CAMPINO et al., 2008). O uso da cultura parasitológica como padrão de referência no diagnóstico da LVC é questionável, pois a contaminação ou a fraca adaptação do parasito ao meio

podem prejudicar a sensibilidade dessa técnica e subestimar a precisão de outros testes (FURTADO et al., 2015).

Aqueles que tentam isolar a cepa de *Leishmania* “*in vitro*” frequentemente enfrentam o problema de contaminação das culturas por várias espécies de bactérias e leveduras (SUNDAR E RAI, 2002), especialmente quando se trabalha sob condições de campo e/ou com amostras de reservatórios ou vetores (SCHNUR E JACOBSON, 1987). Por isso, deve se estabelecer protocolos de limpeza e antissepsia adequados de acordo com o ambiente e local de coleta. Com o objetivo de prevenir a contaminação microbiológica, compostos antimicrobianos frequentemente adicionados ao meio usado para culturas de *Leishmania*, para limitar o crescimento de bactérias e/ou leveduras (YAYON et al., 1984), mas essa prática pode não ser totalmente benéfica. Os agentes antimicrobianos podem matar ou inibir a multiplicação de certos genótipos de parasitas (SCHNUR E JACOBSON, 1987) ou certos genótipos de organismos contaminantes (SMITH AND COAST, 2002).

Como consequência, esses antimicrobianos levam à seleção de subpopulações específicas dos parasitas ou de microrganismos que não podem mais ser controlados com os antibióticos. Alguns agentes antimicrobianos são conhecidos por terem forte atividade antileishmania (ALI et al., 1997) e agentes antifúngicos como 5-fluorocitosina pode ser mutagênico (LOCKHART, 1998). Nas áreas onde as leishmanioses são endêmicas, normalmente há poucos recursos e os agentes antimicrobianos frequentemente usados podem ser muito caros. Além disso, a remoção completa da contaminação nas culturas de *Leishmania* sp. pela adição de agentes antimicrobianos pode exigir tantas subculturas em meio fresco (SCHNUR E JACOBSON, 1987), que o procedimento se torna muito trabalhoso e demorado.

Com relação a prevenção da contaminação microbiológica da cultura parasitológica, as técnicas de coleta de PASA, PAAF e NL tiveram um bom desempenho, obtendo uma taxa de contaminação inferior a 5%. A técnica de coleta que apresentou o maior índice de contaminação foi PASA. Uma possível explicação para esse resultado negativo da PASA seria o fato de que nessa técnica a guia da agulha de punção fica diretamente em contato com a pele. Além disso, a agulha de punção da PASA é mais calibrosa do que a agulha da técnica de PAAF, entrando em contato com uma maior área de pele. Segundo Sundar e Rai et al. (2002), a pele apresenta uma grande variedade de microrganismos contaminantes que podem interferir nos resultados da cultura parasitológica. A frequência de contaminação

microbiológica da NL foi igual a da PAAF e menor do que a da PASA, provavelmente por que nessa técnica a amostra é coletada diretamente do linfonodo dissecado, sem contato com a pele. No presente estudo, os contaminantes foram leveduras, que por se desenvolverem rapidamente prejudicam a leitura e crescimento do parasito conforme relatado por Muniaraj et al. (2005). Esse problema de contaminação pode ser resolvido com uma maior antisepsia da pele antes da coleta, com a realização de mais de três repetições na passagem de compressão de gaze estéreis embebidas em clorexidine a 2%, iodopovidona 10% e álcool 70% na pele tricotomizada no local da punção. Mesmo com a contaminação não houve prejuízo para o diagnóstico dos animais, visto que outras amostras não contaminaram e foi possível identificação e isolamento do parasito.

No presente estudo, a imuno-histoquímica demonstrou ter uma boa capacidade de detecção de formas amastigotas de *Leishmania* no linfonodo de cães soropositivos para *L. infantum*, semelhante à da cultura parasitológica. A vantagem para a cultura parasitológica, é que a IHQ não está sujeita a perdas por contaminação microbiológica, sobretudo quando as coletas das amostras são realizadas a campo. Além disso, em relação à técnica de histopatologia, a imuno-histoquímica mostrou um desempenho bem melhor para diagnóstico de *Leishmania* sp. em linfonodo, estando de acordo com outros autores (MOREIRA et al., 2007; MAIA et al., 2009). Moreira et al. (2007) e Maia et al. (2009) encontraram uma variação de frequência de positividade entre 65,85 – 92,68% para IHQ e 39,13 – 43,90% para H.E. na detecção de formas amastigotas de *Leishmania* sp. No nosso estudo encontramos uma frequência de positividade para *L. infantum* em NL inferior ao descrito por Furtado et al. (2015) e Guerra et al. (2019) que encontraram 81,5% e 92% de positividade para *Leishmania* sp. em NL+IHQ, respectivamente. Essa diferença pode estar relacionada a maior quantidade de amostras analisadas por esses autores, que foi de 72 e 50 cães, e aos distintos protocolos da técnica de IHQ utilizados. Apesar desse bom desempenho e de ser uma ferramenta útil no diagnóstico de *Leishmania* em cães, sobretudo em linfonodo, a IHQ não consegue definir a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, diferente da CP quando associada a eletroforese de enzimas “multilocus”. Ademais, a técnica de IHQ apresenta limitações de sensibilidade, que varia em torno de 50 a 70%, sendo inferior a técnica de PCR (OLIVEIRA et al 2017).

As frequências de positividade de baço, medula óssea, fígado, linfonodo, trato genital e pele para diagnóstico de *L. infantum* em cães variam entre 50 e 94% e são

os que apresentam as maiores taxas de positividade na cultura (MOREIRA et al., 2007; MAIA et al., 2008; COSTARDI et al., 2009; FRANCO, P. A; GUIMARÃES, E.P; ZORZATTO, 2013; MELLO et al., 2014; FURTADO et al., 2015; BOECHAT et al., 2016; GUERRA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). Entretanto existem divergências quanto ao tecido de escolha para diagnóstico.

Nesse estudo, a alta frequência de positividade no linfonodo independentemente da técnica de coleta nesse, corroboram com os resultados de outros estudos que obtiveram as maiores frequências de positividade para esse órgão em comparação com outros. Mello et al. (2014) em 141 cães soropositivos (também por DPP® e ELISA) da mesma região que estudamos relataram uma frequência de positividade de 73,8% para fragmento de necropsia de linfonodo, 69,5% para fragmento de baço, 58,5% para fragmento de pele, 56,7% punção de medula-óssea e 52,3% para punção agulha fina de linfonodo. Furtado et al. (2015), detectaram *L. infantum* em 65,8% dos 65 cães soropositivos (DPP+ELISA) analisados, com uma frequência de positividade de 72,3% para fragmento de necropsia de linfonodo, 56,9% para fragmento de pele, 53,8% punção de medula-ossea e 52% para fragmento de baço. Entretanto, devido a maior frequência de isolamento de *L. infantum* na cultura de baço comparada a de outros órgãos, Barrouin–Melo et al. (2005) apoiaram o uso deste tecido como órgão de escolha para os diagnóstico parasitológicos da infecção por *Leishmania* em cães. Porém, de acordo com Maia e Campino et al. (2008), o procedimento de punção de baço é invasivo para coleta de material biológico, o que é um motivo válido para evitá-lo, usando o linfonodo popliteo em seu lugar. Também, segundo esses autores, caso o linfonodo popliteo não esteja detectável, a punção de medula ossea é uma alternativa adequada para o diagnóstico.

No presente estudo o principal sinal clínico analisado foi a linfadenomegalia e a frequência de positividade para *L. infantum* em função da presença ou ausência deste sinal apresentou melhores resultados em cães com linfadenomegalia independente da técnica de coleta. Uma possível explicação para esse resultado, é que o aumento do tamanho do linfonodo está relacionado ao processo inflamatório provocado pelo aumento do número de parasitos, e, conseqüentemente, a frequência de positividade aumenta em cães com esse sinal clínico. Além disso é possível obter uma maior quantidade de tecido ou aspirado de um linfonodo aumentado, comparado ao linfonodo de tamanho normal.

Os resultados deste estudo sugerem que o protocolo sorológico utilizando DPP® e ELISA para o diagnóstico sorológico e pesquisa da LVC apresenta resultados satisfatórios, contribuindo para a diminuição da eutanásia de cães não infectados causada por resultados falso-positivos. Isso porque, apenas um cão incluído neste estudo apresentou resultado negativo em todos os testes confirmatórios realizados, além disso, também não apresentou sinais clínicos. Também é razoável classificá-lo como “cão exposto” de acordo com os critérios de (PALTRINERI et al., 2010), pois moravam em regiões endêmicas onde a circulação de *L. infantum* era confirmada. Embora esse cão tenha sido positivo em dois testes sorológicos diferentes o teste imunocromatográfico DPP® como triagem e o teste e ELISA como confirmatório, não podemos rejeitar a possibilidade de resultado falso-positivo, sobretudo por se tratar de um cão sem sinais clínicos. Em estudos anteriores, o teste DPP® mostrou especificidade variando de 87,8% a 98,6% e sensibilidade entre 90,6% e 98% usando amostras positivas confirmadas por Mendonça et al. (2017). No entanto, apesar de mostrar altos níveis de sensibilidade em cães clinicamente sintomáticos, a sensibilidade do teste DPP® para identificar a infecção por *Leishmania* em cães assintomáticos foi de apenas 47% em um dos estudos (GUIMARÃES, 1985). Em uma revisão sistemática e uma metanálise dos dados de 25 estudos, Peixoto et al. (2015) concluíram que os testes ELISA usando antígenos brutos e os testes DPP® têm precisão moderada apresentando 83% sensibilidade e 73% especificidade.

Segundo Ribeiro et al. (2019), os resultados de testes rápidos devem ser cuidadosamente avaliados em cães assintomáticos por apresentarem um baixo título de anticorpos por sua vez, apresentam falhas de sensibilidade. Portanto, deve-se considerar a possibilidade de interferência de outros agentes infecciosos nessas áreas, incluindo *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, como observado anteriormente (MARCONDES et al., 2011; MADEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015). Essa possibilidade é reforçada pela soroprevalência canina relatada de 47% de parasitas transmitidos por carrapatos na região leste do Rio de Janeiro (WILLI et al., 2017). Além disso outras espécies de *Leishmania*, como *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, foram confirmados em ambientes enzoóticos de *L. infantum* e podem gerar reações cruzadas, conforme descrito por Paz et al. (2018). Os resultados deste estudo sugerem que o protocolo sorológico utilizando DPP® e ELISA para o diagnóstico sorológico e pesquisa da LVC apresenta resultado satisfatório, contribuindo para a

diminuição da eutanásia de cães não infectados causada por resultados falso-positivos. Visto que somente um animal apresentou resultado negativo em todas as técnicas de diagnóstico. Em relação aos outros três animais que não apresentaram sinais clínicos, todos tinham em comum o diagnóstico através da cultura parasitológica por pelo menos uma técnica de coleta de amostras, extraídas do linfonodo popliteo. Isso evidencia que mesmo em cães assintomáticos o linfonodo se mostrou um ótimo tecido de escolha para o diagnóstico da LVC.

A agulha semiautomática para tecidos moles (ASATM) não é muito utilizada na Medicina Veterinária (NÉSPOLI et al., 2010), por se tratar de uma ferramenta que necessita treinamento e padronização em função dos tamanhos existentes no mercado, já que os cães apresentam portes muito diferentes uns dos outros, além de ter um custo elevado. Apesar de seguir os protocolos, a prática inicial com o produto no presente estudo foi difícil, e o treinamento é muito importante para garantir a praticidade da coleta e qualidade nas amostras coletadas.

8. CONCLUSÃO

- A frequência de positividade de *Leishmania* sp. em amostras de linfonodo poplíteo de cães soropositivos para esse parasito foi alta e com taxas de crescimento rápido na cultura parasitológica, confirmando que esse tecido é um excelente alvo para o diagnóstico de *L. infantum*.
- A técnica de imunohistoquímica em amostra de linfonodo coletada por NL apresentou uma alta frequência de positividade para *Leishmania* sp., semelhante a da cultura parasitológica, sendo uma ferramenta útil e alternativa para o diagnóstico parasitológico de *Leishmania* sp.
- A técnica de coleta por punção por agulha semiautomática em linfonodo poplíteo combinada a cultura parasitológica se mostrou uma nova ferramenta para o diagnóstico de *L. infantum* em cães, pela alta frequência de positividade, especificidade, baixa taxa de contaminação microbiológica e tempo de diagnóstico de 7 a 15 dias.
- A técnica de coleta por PAAF em linfonodo poplíteo combinada a cultura parasitológica foi a que obteve melhor desempenho entre as técnicas de coleta de linfonodo, pela maior praticidade, maior frequência de positividade, alta especificidade, bem como baixa taxa de contaminação microbiológica e alta taxa de crescimento rápido na cultura parasitológica.
- As técnicas utilizadas na coleta de amostras de linfonodo poplíteo: PAAF, PASA e NL apresentaram, seguindo o protocolo de limpeza e antissepsia sugerido no estudo, uma baixa taxa de contaminação microbiológica (bactérias e fungos) na cultura parasitológica.

9. PROCEDIMENTO ÉTICO

Os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA / Fiocruz; Número LW-20/19).

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S et al. *Imunologia Celular e Molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; p.525-38, 2008.

ALMEIDA ABPF, SOUSA VRF, BOA SORTE EC, FIGUEIREDO FB, DE PAULA DAJ, PIMENTEL MFA et al. Use of Parasitological Culture to Detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Naturally Infected Dogs. *Vector-Borne Zoonotic Dis.*;11(12):1555-60, 2011.

ALVAR J, VÉLEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.*;7(5):e35671, 2012.

BARROUIN-MELO SM, LARANGEIRA DF, TRIGO J, AGUIAR P.H, DOS-SANTOS WL, PONTES-DE-CARVALHO L, et al. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*; 99:195–197, 2004.

BARROUIN-MELO SM, LARANJEIRA DF, ANDRADE FILHO FA, TRIGO J, JULIÃO FS, FRANKE CR, et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Vet J*; 171:331-339, 2005.

BOECHAT, V.C.; MENDES JUNIOR, A.A.V.; MADEIRA, M.F.; FERREIRA, L.C.; FIGUEIREDO, F.B.; et al. Occurrence of *Leishmania infantum* and associated

histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. *Parasitol Res*, 115: 2371–9, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2011a. Nota técnica conjunta no 01/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). SIPAR 25000.227.865/2011-11. [Acesso em 01 fev. 2020].

BRASIL. Ministério da Saúde. 2011b. Reunião de validação dos kits de diagnóstico da leishmaniose visceral. Technical report. Brasília. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2006..

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde. p.28-29, 2014

BRITO LEAL C.R. Available and possible methods for the diagnosis of American canine visceral leishmaniasis. *Bepa*;6(69):14-18, 2009.

BRITO B.J. IDENTIFICATION OF *Leishmania* spp. By the paaf's method of lymph nodes from positive dogs to lvc. *Revista Bionorte*,v. 6, S1, dez. 2017.

CARDIM, M.F.M.; GUIRADO, M.M.; MARGARETH REGINA DIBO, M.R. et al. Leishmaniose visceral no estado de São Paulo, Brasil: análise espacial e espaço-temporal. *Rev Saúde Pública*. v.50, n.48, 2016

CAMPOS, M.P.; DE LUCA, P.M.; RENZETTI, A.R.S. et al. Can vaccines against canine visceral leishmaniasis interfere with the serological diagnostics recommended by the Brazilian Ministry of Health? *Cienc. Rural*, v.47, p. 1-6, 2017a.

CAMPOS-PONCE M, PONCE C, PONCE E, MAINGON RDC. *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on *Leishmania* tropism in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. *Experimental Parasitology*, New York, v. 109, p. 209–219, 2005.

CAVALCANTI MP, LORENA VMB, GOMES YM et al. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. *Rev Patol Trop.*; 37(1):1-14, 2008.

CORTES, S.; VAZ, Y.; NEVES, R.; MAIA, C.; CARDOSO, L.; CAMPINO, L. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 189, n. 2-4, p. 189-196, 2012.

COSTARDI, M.L. Imunohistoquímica em diferentes tecidos de cães com Leishmaniose Visceral. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

CUPOLILLO E., GRIMALDI J.G., MOMEN H et al. A general classification of new world *Leishmania* using numeral zymotaxonomy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50:296-311, 1994;.

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v.40, n.3, p.537-541, 2006.

DA SILVA, S. M.; RABELO, P. F. B.; GONTIJO, N. F.; RIBEIRO, R. R.; MELO, M. N.; RIBEIRO, V. M.; MICHALICK, M. S. M. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 174, n. 1-2, p. 150-154, 2010.

DA SILVA DT, STARKE-BUZETTI WA, ALVES-MARTIN MF, PAIXÃO MS, TENÓRIO MS, LOPES MLM et al. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. *Braz J Vet Parasitol.*;23(2):179-86, 2014.

EVANS D. Handbook on Isolation Characterization and Cryopreservation of *Leishmania*. World Health Organization, Geneva;. pp.45, 1989.

FARIA AR, ANDRADE HM et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Rev Pan-Amaz Saúde.*;3(2):47-57, 2012.

FIGUEIREDO FB, MADEIRA MF, MENEZES RC, PACHECO RS, PIRES MQ, FURTADO MC et al. Efficacy of an indirect immunofluorescence test in the diagnosis of canine leishmaniosis. *Vet J.*;186(1):123-4, 2010.

FIGUEIREDO FB, MADEIRA MF, NASCIMENTO LD, ABRANTES TR, MOUTA-CONFORT E, PASSOS SR et al. Canine visceral leishmaniasis: study of methods for

the detection of IgG in serum and eluate samples. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.*;52(4):193-6, 2010.

FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA DA, R. T.; SIQUEIRA, A.M.; et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil, *Veterinary Parasitology.*, v. 111, p. 161-173, 2003.

FRANCO, P. A; GUIMARÃES, E.P; ZORZATTO, J.R.; Immunohistochemical diagnosis of visceral Leishmaniasis in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 34º CBA. 2003.

FREITAS, M. V. M; BRUN, C.F.L.; RODRIGUES, M. C. et al. Ocular diseases in dogs naturally affected by visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí, Brazil. *Cienc. Rural, Santa Maria*, v.47, n. 10, 2017.

FUNED Fundação Ezequiel Dias. Manual do Programa de Avaliação da Qualidade. Imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. Avaliação da Qualidade do TR DPP® no Campo. IOM/DECD/SDP Novembro 2013.

FURTADO MC. Comparative study of in situ hybridization, immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors.*;8:620, 2015.

FURTADO, M. V. L.; VIOL, M. A.; BABO-TERRA, V. J. Pesquisa de amastigotas de *Leishmania* spp. em linfonodos, medula óssea, baço, pele e sangue de cães naturalmente infectados. PUBVET, Londrina, v. 5, n. 30, Ed. 177, Art. 1198, 2011.

GENARO O., RASO P et al. Leishmaniose tegumentar americana. São Paulo; Americana. In: Brasileiro Filho, G et al. Bogliolo Patologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

GONTIJO CMF, MELO MN et al. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras de Epid. 2004;7(3)

GRIMALDI JR G, TEVA A, FERREIRA AL, DOS SANTOS CB, PINTO IS, DE-AZEVEDO CT et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Plataform (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Trans Royal Soc Trop Med Hyg.;106:54-59, 2012.

GIUNCHETTI, R. C., MARTINS-FILHO, O. A., CARNEIRO, C. M., MAYRINK, W., MARQUES, M. J., TAFURI, W. L., CORREIA-OLIVEIRA, R., REIS, A. B et al. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis, Veterinary immunology and immunopathology, Amsterdam, v.121, p.23-33, 2008.

GUERRA, J.M.; FERNANDES, N.C.C.A.; KIMURA, L.M.; et al. Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras de tecidos caninos. Rev Inst Adolfo Lutz., v. 75, n. 1686, 2016.

GUIMARÃES MCS. Exames de laboratório: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo. Rev Soc Bras Med Trop .;18(2):117-20, 1985.

KOUTINAS AF, KOUTINAS CK. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. Vet Pathol.;51(2):527-38, 2014.

LAINSON, R. Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, n. 18, p. 47-56, 1985.

LAURENTI MD, ROSSI CN, DA MATTA VL, TOMOKANE TY, CORBETT CE, SECUNDINO NF et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. Vet Parasitol. 196(3-4):296-300, 2013.

LOCKHART, D. J. Nature Medicine, 4, 1239–1301. Okot-Kotber, B. M. Parasitology, 91, 1–7. OLIVER, S. G. & WILLIAMSON, D. H. Biochemical Genetics, 15, p. 775–783, 1998.

WILLI LMV, MENDES-DE-ALMEIDA F, SOUZA CSF, LAETA T, PAIVA JP, MARCIA MGN, et al. Serological evidence of canine exposure to arthropod-borne pathogens in different landscapes in Rio de Janeiro, Brazil. Vet Parasitol .;7:40-4, 2017.

MADEIRA MF, FIGUEIREDO FB, PINTO AG, NASCIMENTO LD, FURTADO M, MOUTA-CONFORT E, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res Vet Sci.*;87(2):260-2, 2009.

MADEIRA MF, FIGUEIREDO FB, PINTO AG, NASCIMENTO LD, FURTADO M, MOUTA-CONFORT E, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res Vet Sci.*;87(2):260-2, 2009a

MADEIRA, M.F.; SOUSA, M.A.; BARROS, J.H. et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology.*, p.411–23, 2009b.

MADEIRA MF, SCHUBACH AO, SCHUBACH TMP, PEREIRA SA, FIGUEIREDO FB, BAPTISTA C et al. “Post mortem” parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol.*138:366-70, 2006.

MADEIRA MF, ALMEIDA ABPF, BARROS JHS, OLIVEIRA TSF, SOUSA VRF, ALVES AS, et al. *Trypanosoma caninum*, a new parasite described in dogs in Brazil: aspects of natural infection. *J Parasitol.*;100(2):231-4, 2014.

MAIA C, RAMADA J, CRISTÓVÃO JM, GONÇALVES L, CAMPINO L et al. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J.*; 179:142–4, 2009.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.*v.158, n.4, p.274-87, 2008.

MANNA L, VITALE F, REALE S, CARACAPPA S, PAVONE LM, MORTE RD, CRINGOLI G, STAIANO N, GRAVINO AE et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol.*125(3-4):251-62, 2004.

MARCONDES M, BIONDO AW, GOMES AA, SILVA AR, VIEIRA RF, CAMACHO AA, et al. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Vet Parasitol .*;175(1-2):15-9, 2011.

MARZOCHI MCA, MARZOCHI KBF. Leishmanioses em áreas urbanas. *Rev da Soc Bras de Med Trop.*; 30:162-167, 1997.

MELLO CX, FIGUEIREDO FB, MENDES JUNIOR AA, FURTADO MC, MIRANDA LFC, MADEIRA MF. Outbreak of canine visceral leishmaniasis in Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.*;47(6):788-90, 2014.

MELO S. N. 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. *Preventive Veterinary Medicine* 161 p. 19-24, 2018.

MENDES,et al. The impact of climate change on leishmaniasis in Brazil. *Ciência. Saúde coletiva* [online]. vol.21, n.1, pp.263-272, 2016

MENDONÇA IL, BATISTA JF, WERNECK GL, SOARES MRA, COSTA DL, COSTA CHN. Serological tests fail to discriminate dogs with visceral leishmaniasis that transmit *Leishmania infantum* to the vector *Lutzomyia longipalpis*. Rev Soc Bras Med Trop.;50(4):483-88, 2017.

MENEZES RC, FIGUEIREDO FB, WISE AG, MADEIRA MF, OLIVEIRA RV, SCHUBACH TM et al. Sensitivity and Specificity of in situ Hybridization for the diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs. J Clin Microbiol. 55(1):206-211, 2013.

MOLINA, R.; JIMENEZ, M. I.; CRUZ, I.; IRISO, A.; MARTÍN-MARTÍN, I.; SEVILLANO, O.; MELERO, S.; BERNAL, J. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 190, p. 268-271, 2012.

MONTALVO, A. M.; FRAGA, J.; MONZOTE, C. L.; GARCIA, G.; FONSECA, L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. Revista Cubana de Medicina Tropical, Habana, v.64 ,n. 2, 2012.

MOREIRA, M.A.; LUVIZOTTO, M.C.; GARCIA, J.F.; et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of Leishmaniasis in dogs with different clinical signs, Vet Parasitol., v. 145, n. 3-4, p. 245-252, 2007

MOREIRA, P. R. R et al. Apoptose em linfonodos de cães com leishmaniose visceral. Dissertação. Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP. Jaboticabal, 2010.

M. MUNIARAJ et al Removal of bacterial and yeast contamination from *Leishmania* promastigote cultures, by agar plating Annals of Tropical Medicine & Parasitology, - Vol. 99, No. 5, p. 1–5, 2005.

Nota técnica conjunta nº 01/2011b- CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina. 2011.

OLIVEIRA TSF, BARROS JHS, PEREZ TD, FIGUEIREDO FB, MENDES JÚNIOR AAV, MADEIRA MF. AAV. Report of new cases of *Trypanosoma caninum* in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop .;48(3):347-9, 2015.

PALATNIK-DE-SOUSA CB, DOS SANTOS WR, FRANCA-SILVA JC, DA COSTA RT, REIS AB, PALATNIK M et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg.; 65(5):510-7, 2001.

PALTRINIERI S, SOLANO-GALLEGO L, FONDATI A, LUBAS G, GRADONI L, CASTAGNARO M, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. J Am Vet Med Assoc.;236(11):1184-91, 2010.

PARANHOS-SILVA M, FREITAS LA, SANTOS WC, GRIMALDI GJ, PONTES-DE-CARVALHO LC, OLIVEIRA-DOS-SANTOS AJ et al. A cross-sectional serodiagnostic

survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. Am J Trop Med Hyg.; 55(1):39-44, 1996.

PAZ GF, RUGANI, JMN, MARCELINO AP, GONTIJO CMF et al. Implications of the use of serological and molecular methods to detect infection by *Leishmania spp.* in urban pet dogs. Acta Trop. Jun;182:198-201, 2018.

PEDRO B. NÉSPOLI PB et al. Evaluation of hepatic biopsy techniques in sheep. Pesq. Vet. Bras. vol.30 no.1, 2010.

PEIXOTO HM, OLIVEIRA MRF, ROMERO GAS. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. Trop Med Int Health.;20(3):334-52, 2015.

PIMENTEL MI, ALVES EL, SILVA MH, MOZA PG, ALMEIDA PM, CUNHA CS et al. High visceral leishmaniasis mortality rate in Barra Mansa, a new area of visceral leishmaniasis transmission in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop.;47(4):521-3, 2014.

PEREZ, T.D.; FIGUEIREDO, F.B.; JUNIOR, A.A. et al. Prevalence of american trypanosomiasis and leishmaniasis in domestic dogs in a rural area of the municipality of São João do Piauí, Piauí State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. v.3, n.58, p.79, 2016.

OLIVEIRA CD, MORAIS MH, MACHADO-COELHO GL. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. Cad Saude Publica.;24(12):2953-8, 2008.

OLIVEIRA, V. C.; BOECHAT, V. C.; MENDES, A.A.V.; et al. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. PLoS ONE., v.12, n. 4, p. 1-15, 2017.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE - OPAS. Encuentro sobre vigilancia, prevención y control de leishmaniasis visceral (LV) en el Cono Sur de Sudamérica. Foz do Iguazú, Brasil. 2009. Disponível em: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=16961&Itemid=, Acesso em: 02 dez. 2019.

QUEIROZ, N.M.G.P.; SILVEIRA, R.C.V.; NORONHA JR, A.C.F. et al. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. Vet. Parasitol. v.178, n.1-2, p.1-8, 2011.

QUINTELLA LP, CUZZI T, MADEIRA MF, OKAMOTO T, SCHUBACH AO. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. Rev Inst Med Trop São Paulo.51:83-86, 2009.

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

SCHNUR, L. F. & JACOBSON, R. L. In *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Volume 1: Biology and Epidemiology, eds Peters, W. & Killick-Kendrick, R. pp. 500–541. London: Academic Press, 1987.

SCHUBACH EY, FIGUEIREDO FB, ROMERO GA. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*;11:1-7, 2014.

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

SILVA DA, MADEIRA MF, TEIXEIRA AC, DE SOUZA CM, FIGUEIREDO FB. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol.*;179:257-61, 2011.

SILVA, A. R. S. Leishmaniose visceral canina: estudo imaginológico em cães naturalmente infectados. Tese. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2014.

SMITH, R. D. & COAST, J. *Bulletin of the World Health Organization*, -80, p.126–132, 2002.

SOLANO-GALLEGO L, MIRÓ G, KOUTINAS A, CARDOSO L, PENNISI MG, FERRER L et al. Leishvet Guidelines for the Pratical Management of Canine Leishmaniosis. *Parasit Vectors.*;4:86, 2011.

SOLCÀ MDA S, BASTOS LA, GUEDES CE, BORDONI M, BORJA LS, LARANGEIRA DF et al. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. World Health Organization Control of Leishmaniasis: Technical Report Series.; p 949, 2010.

SOUZA, A.P.L.; JESUS, J.R.; TEIXEIRA, M.C et al. Estudo retrospectivo da epidemiologia da leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul: revisão de literatura. Veterinária em Foco, v.11, n.2, jan. /jun. 2014.

SUNDAR, S. & RAI, M. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, - 9, p. 951–958, 2002.

TEIXEIRA, L. V.; LOPES T. A.; MARTINS, D. B.; FRANÇA, R. T.; FIGHERA, R. A. et al. Punção aspirativa por agulha fina como método de coleta de material para a histopatologia no osteossarcoma canino. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, Feb. 2010.

VISVESVARA, G. S. & GARCIA, L. S. Clinical Microbiological Reviews, -15 p. 327–328, 2002.

YAYON, A., FRIEDMAN, S. & GINSBURG, H. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, - 78, p.167–168, 1984.

XAVIER SC, DE ANDRADE HM, MONTE SJ, CHIARELLI IM, LIMA WG, MICHALICK MS et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. BMC Vet Res.; 2:17, 2006.

ZANETTE, M. F. Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. 2006. 70 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2006. Disponível em <<http://hdl.handle.net/11449/92183>>. Acesso em: 21 dezembro de 2019.

ZANETTE MF, LIMA VM, LAURENTI MD, ROSSI CN, VIDES JP, VIEIRA RF et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. Rev Soc Bras Med Trop.;47(1):105-7, 2014.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION Control of Leishmaniases. Technical Report Series 2010.

ANEXO A - FICHA DE INFORMAÇÕES E DADOS VETERINÁRIOS



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas


INI
 Instituto Nacional de Infectologia
 Evandro Chagas

PROTOCOLO DE CAMPO VETERINÁRIO

1-Nº: 2-DATA DE COLETA: / /

3-NOME DO ANIMAL:

4-PROPRIETÁRIO:

5-ENDEREÇO:

6-BAIRRO: 7-ESTADO:

8-CIDADE: 9-TELEFONE: -

10-RAÇA: SRD OUTROS ANIMAL

11-SEXO: MACHO FÊMEA 12-IDADE: ATÉ 12 MESES ACIMA DE 1 ANO ATÉ 7 ANOS ACIMA DE 7 ANOS

13-TIPO DE PELAGEM: CURTO LONGO 14-PESO: ,

15-VACINAÇÃO: NÃO V8 V10 ANTI-RÁBICA CONTRA LEISHMANIOSE

16-OUTRAS:

17-CASTRADO: SIM NÃO

EXAME CLÍNICO

18-ESTADO GERAL: BOM REGULAR RUIM 19-CONDIÇÃO CORPORAL: MUITO MAGRO MAGRO NORMAL OBESO

20-MUCOSAS: HIPOCORADAS NORMOCORADAS HIPERÉMICAS ICTÉRICAS 21-TEMPERATURA: ,

22-DESIDRATAÇÃO: AUSENTE LEVE SEVERA 23-PRENHEZ: SIM NÃO

24-PRESENÇA DE ECTOPARASITOS: NÃO PIOLHOS PULGAS CARRAPATOS OUTROS

25-LESÕES CUTÂNEAS: SIM NÃO 26-INÍCIO DAS LESÕES: 27-Nº DE LESÕES:

28-LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES: ORELHA NARIZ ESCROTO NÃO SE APLICA

OUTRAS

29-USO DE MEDICAMENTOS: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	30-QUAL MEDICAMENTO: <table border="1" style="width: 100%; height: 20px; border-collapse: collapse;"></table>
--	--

SINAIS CARACTERÍSTICOS

31-PERDA DE APETITE: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	32-EMAGRECIMENTO: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	33-CAQUEXIA: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	34-APATIA: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO
35-DISTÚRBO URINÁRIO: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	36-ALOPECIA LOCAL: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	37-ALOPECIA GENERALIZADA: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
38-DESCAMAÇÃO CUTÂNEA FURFURÁCEA: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	39-PÊLO OPACO: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	40-ÚLCERA CROSTOSA: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	41-ONICOGRIFOSE: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO
42-EPISTAXE: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	43-ALTERAÇÕES OPTÁLMICAS: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	44-ADENITE REGIONAL: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	45-ADENITE GENERALIZADA: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO
46-ESPLENOMEGALIA: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	47-HEPATOMEGALIA: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	48-DOR A PALPAÇÃO RENAL: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
49-ARTRALGIA: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	50-EDEMA DE MEMBROS: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	51-PAREZIA DOS MEMBROS POSTERIORES: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

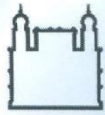
52-DOMICÍLIO: <input type="checkbox"/> ÁREA URBANA <input type="checkbox"/> ÁREA RURAL <input type="checkbox"/> REGIÃO DE MATA	53-AMBIENTE DO ANIMAL: <input type="checkbox"/> DENTRO DE CASA <input type="checkbox"/> QUINTAL <input type="checkbox"/> ACESSO À RUA	54-CONVIVE COM OUTROS ANIMAIS: <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> SIM QUAIS? <table border="1" style="width: 100%; height: 20px; border-collapse: collapse;"></table>
55-ALGUM MORADOR COM LEISHMANIOSE? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO QUANTOS? <table border="1" style="width: 100%; height: 20px; border-collapse: collapse;"></table>		
56-ALGUM ANIMAL JÁ RECOLHIDO COM SUSPEITA DE LEISHMANIA? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		

MATERIAL COLETADO

57-BIÓPSIA: <input type="checkbox"/> PELE DE ORELHA <input type="checkbox"/> PELE DE ESCÁPULA	<input type="checkbox"/> LESÃO <input type="checkbox"/> NÃO COLETADA	58-PCR: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	59-SANGUE: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO
---	---	---	--

OBSERVAÇÕES:

ANEXO B – LICENÇA CEUA



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Vice- Presidência de Pesquisa e
 Coleções Biológicas



**Comissão de Ética
 no Uso de Animais**

LICENÇA**LW-20/19**

Certificamos que o protocolo (P-30/18-4), intitulado "Utilização de agulha semiautomática para tecidos moles, como ferramenta de coleta, para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina a partir de fragmentos de linfonodo.", sob a responsabilidade de Rodrigo Caldas Menezes, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 29/04/2021 e inclui o uso total de :

canis familiaris
 - 15 Machos.
 - 15 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 29 de abril de 2019

Octavio Augusto França Presgrave
 Coordenador da CEUA

Etelcia M. Molinaro
 Vice - Coordenador
 CEUA / FIOCRUZ
 SIAPE: 0463096