

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



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

RICARDO GONÇALVES SILVA

**ESTUDO COMPARATIVO DAS TÉCNICAS DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* E
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - QUANTITATIVA (qPCR) PARA O
DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO CUTÂNEA POR *Leishmania infantum* EM CÃES**

Rio de Janeiro

2018

RICARDO GONÇALVES SILVA

ESTUDO COMPARATIVO DAS TÉCNICAS DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - QUANTITATIVA (qPCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO CUTÂNEA POR *Leishmania infantum* EM CÃES

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia (INI) para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Caldas Menezes

Rio de Janeiro

2018

RICARDO GONÇALVES SILVA

ESTUDO COMPARATIVO DAS TÉCNICAS DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - QUANTITATIVA (qPCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO CUTÂNEA POR *Leishmania infantum* EM CÃES

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia (INI) para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Rio de Janeiro, 28 de março de 2018

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Caldas Menezes

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sandro Antônio Pereira (presidente)

Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

Instituto Nacional de Infectologia

Prof.^a. Dr.^a. Fernanda Nazaré Morgado

Doutora em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

Instituto Nacional de Infectologia

Prof.^a. Dr.^a. Luísa Helena Monteiro de Miranda

Doutora em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

Instituto Nacional de Infectologia

*À minha mãe Ermelinda
pela sua dedicação, apoio e incentivo
em todas as etapas de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom precioso da vida, pela força e serenidade que sempre me concedeu nos momentos difíceis.

À minha mãe Ermelinda, que com coragem e dignidade superou todas as dificuldades e inculuiu em nós a certeza de que somente com dedicação, trabalho e estudo poderíamos mudar nosso destino.

À minha irmã Ana Paula e ao meu sobrinho Vinícius pelo companheirismo nesta jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Caldas Menezes pela confiança e dedicação.

Ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/Bio-Manguinhos, pela oportunidade e permissão para realização do curso de Mestrado.

À Darcy Akemi Okama, chefe do Departamento de Controle da Qualidade e Igor Barbosa da Silva, chefe do Laboratório de Controle Microbiológico pelo incentivo, confiança e dispensa para realização do curso de Mestrado.

À Alessandra dos Santos, chefe da Seção de Controle Biológico, pelo apoio e compreensão em todos os momentos dedicados à execução deste trabalho.

Aos colegas de trabalho Daiane Ribeiro, Daniele David, Elaine Cristina, Katherine Antunes e Vitor Fernandes pelo companheirismo, incentivo e colaboração durante este período.

À Greice Maria Silva da Conceição pelo auxílio na análise estatística dos dados.

À Natália Pedra Gonçalves pelo orientação e auxílio na realização das técnicas moleculares.

A Luiz Cláudio Ferreira e Francisco das Chagas de Carvalho Rodrigues do Serviço de Anatomia Patológica do INI, pela orientação e auxílio durante as técnicas histológicas.

À equipe do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses (LAPCLIN- DERMZOO) pelo auxílio e companheirismo durante a realização deste projeto.

À coordenação de Pós-Graduação do INI/Fiocruz pela possibilidade de realização do Curso de Mestrado e pela constante atenção dispensada a todos.

À banca examinadora pela dedicação e disponibilidade na avaliação desta dissertação.

A todos aqueles que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto.

“O saber contra a ignorância, a saúde contra a doença, a vida contra a morte. Mil reflexos da batalha permanente em que estamos envolvidos.”

(Oswaldo Cruz)

SILVA, R.G. **Estudo comparativo das técnicas de hibridização *in situ* e reação em cadeia da polimerase-quantitativa (qPCR) para o diagnóstico da infecção cutânea por *Leishmania infantum* em cães.** Rio de Janeiro, 2018. 68f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

A leishmaniose visceral zoonótica é uma doença causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e de grande importância em saúde pública no Brasil, que acomete humanos e mamíferos domésticos e silvestres. O diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães é feito por meio de técnicas laboratoriais, que devem ser acuradas, pois esses animais são a principal fonte de infecção para o vetor biológico no meio urbano. Amostras de pele fixadas em formalina tamponada a 10% e emblocadas em parafina (FFEP) são muito utilizadas na rotina para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães, por serem um bom alvo e prescindirem de condições ideais de refrigeração e transporte a campo. Muitas vezes essas são as únicas amostras disponíveis para o diagnóstico da espécie de *Leishmania* spp. Nesses casos, o diagnóstico a nível de espécie somente é possível pela utilização da técnica de hibridização *in situ* (ISH) e técnicas de PCR, como a PCR quantitativa (qPCR). Porém, a sensibilidade dessas técnicas em pele FFEP é pouco conhecida. Portanto, o objetivo desse estudo é determinar a sensibilidade das técnicas de ISH e qPCR em amostras de pele FFEP para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães usando amostras de pele positivas na cultura parasitológica (CP) como método padrão de referência. Amostras de pele FFEP de 48 cães, 27 com presença de sinais clínicos e 21 com ausência de sinais clínicos, com infecção cutânea para *L. infantum* confirmada na CP e eletroforese de enzimas *multilocus*, foram examinadas pelas técnicas de ISH e qPCR usando sondas específicas para *L. infantum*. Essas amostras foram coletadas por biópsia de pele íntegra da região escapular de cães de diferentes áreas endêmicas no Brasil, entre 2008 e 2015. A técnica de ISH foi examinada por dois observadores com diferentes experiências em microscopia óptica. As sensibilidades encontradas para as técnicas de qPCR e ISH foram respectivamente 77% e 58%. As sensibilidades da técnica de qPCR em cães com presença de sinais clínicos e ausência de sinais clínicos foram 70,4% e 85,7%, respectivamente. As sensibilidades da técnica de ISH em cães com presença de sinais clínicos e ausência de sinais clínicos foram 55,5% e 62%, respectivamente. A concordância interobservadores na técnica de ISH foi suave ($Kappa=0,32$). ISH apresentou sensibilidade diretamente associada à carga parasitária quantificada de *L. infantum* na pele. As técnicas de ISH e qPCR apresentaram sensibilidades satisfatórias no diagnóstico da infecção por *L. infantum* em amostras de pele de cães FFEP, inclusive em cães com ausência de sinais clínicos, sendo a qPCR a técnica mais sensível. Quando utilizadas em conjunto, essas duas técnicas aumentam a sensibilidade do diagnóstico de *L. infantum* na pele FFEP de cães e permitem a identificação de infecções ativas por esse parasito.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina. Hibridização *in situ*. *Leishmania infantum*. PCR quantitativa.

SILVA, R.G. **Comparative study of in situ hybridization and quantitative polimerase chain reaction (qPCR) for the diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs.** Rio de Janeiro, 2018. 68f. Master [Science dissertation in Clinic Research in Infectious Diseases] - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

ABSTRACT

The zoonotic visceral leishmaniasis (ZVL) is a disease caused by the protozoan *Leishmania infantum* and of great importance in public health in Brazil, which affects humans, domestic and wild mammals. The diagnosis of *L. infantum* infection in dogs is performed by laboratory techniques, which must be accurate, because these animals are the main source of infection for the biological vector in the urban environment. Formalin-fixed, paraffin-embedded skin samples (FFPE) are frequently used in laboratorial routine for the diagnosis of infection by *L. infantum* in dogs, because are a good target and do not need ideal conditions of cooling and transportation in the field. These are often the only samples available for the diagnosis of *Leishmania* spp. In these cases, the diagnosis at species level is only possible by *in situ* hybridization (ISH) and PCR techniques, as quantitative PCR (qPCR). However, the sensitivity of these techniques is little known. Therefore, the aim of this study was to determine the sensitivity of ISH and qPCR in FFPE skin samples for the diagnosis of *L. infantum* infection in dogs using skin samples positive by parasitological culture (PC) as the reference standard. FFPE skin samples of 48 dogs (27 with clinical signs and 21 without clinical signs) having cutaneous infection by *L. infantum* confirmed by PC and by *multilocus* enzyme electrophoresis were examined by ISH and qPCR using specific probes for *L. infantum*. These samples were collected by biopsy of healthy skin of scapula in dogs from different endemic areas of ZVL in Brazil, between 2008 and 2015. The ISH technique was examined by two observers with different experiences in light microscopy. The sensitivities of qPCR and ISH were, respectively, 77.0% and 58.0%. The sensitivities of qPCR in dogs with and without clinical signs were, respectively, 70.4% and 85.7%. The sensitivities of ISH in dogs with and without clinical signs were, respectively, 55.5% and 62.0%. The interobservers agreement for the ISH was fair ($Kappa=0.32$). The ISH presented sensitivity directly associated with parasitic load quantified of *L. infantum* in the skin. The ISH and qPCR showed satisfactory sensitivities for the diagnosis of *L. infantum* in FFPE skin samples of dogs, even in dogs without clinical signs, being qPCR the most sensitive technique. When used together, these two techniques increase the sensitivity for *L. infantum* diagnosis in the FFPE skin samples of dogs and allow the identification of active infections by this parasite.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis. *In situ* hybridization. *Leishmania infantum*. Quantitative PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de *L. infantum* pelas técnicas de ISH e qPCR-----48

Tabela 2- Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de *L. infantum* pela técnica de ISH de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos -----49

Tabela 3- Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de *L. infantum* pela técnica de qPCR de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos -----50

Tabela 4- Resultados interobservadores para a técnica de ISH no diagnóstico da infecção por *L. infantum* -----50

Tabela 5- Estatística descritiva das cargas parasitárias de *L. infantum* determinadas pela qPCR e expressas em equivalentes genômicos do parasito (gEq) em amostras de pele positivas e negativas para *L. infantum* pela técnica de ISH -----51

Tabela 6- Estatística descritiva das cargas parasitárias de *L. infantum* determinadas pela qPCR e expressas em equivalentes genômicos do parasito (gEq) de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos -----52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Gráfico representativo da curva-padrão utilizada para quantificação de *L. infantum* a partir da amplificação de região do kDNA -----46
- Figura 2 -Hibridização *in situ* em amostra de pele de cão mostrando diversas formas amastigotas de *L. infantum* coradas em azul escuro (setas) e localizadas no citoplasma de macrófagos -----47
- Figura 3- Hibridização *in situ* em amostra de pele de cão mostrando múltiplas áreas de fragmentação do colágeno da derme (setas) provocada pelas etapas de tratamento proteolítico e condicionamento celular da técnica-----48

LISTA DE ABREVIATURAS

μ l	Microlitro
μ m	Micrômetro
6PGDH	6 Fosfogluconato desidrogenase
BCIP	5-bromo-4-cloro-3indolil fosfato
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CISH	Chromogenic <i>In Situ</i> Hybridization
Cq	Ciclo de quantificação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNP	Dinitrofenol
DPP®	Tecnologia de dupla plataforma/ Do inglês: <i>Dual-path platform technology</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EIE	Ensaio imunoenzimático
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FFEP	Fixado em formol e embebida em Parafina
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G6PDH	Glicose-6 fosfato- desidrogenase
gEq	Equivalente genômico
HE	Hematoxilina-Eosina
HRP	Horseradish Peroxidase
ICT	Testes Imunocromatográficos/ Immunochromatographic tests
IDH	NADP - Isocitrato Desidrogenase
IFI	Imunoflorescência Indireta
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imuno-histoquímica
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
ISH	Hibridização <i>in situ</i> . Do inglês <i>In Situ</i> Hybridization
kDNA	DNA de cinetoplasto
LC	Leishmaniose cutânea

LMC	Leishmaniose mucocutânea
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
LVZ	Leishmaniose visceral zoonótica
MDH	Malato Desidrogenase
ME	Enzima Málica
mL	Mililitro
MLEE	Eletoforese de Enzimas / <i>Multi locus enzyme electrophoresis</i>
mm	milímetro
MS	Ministério da Saúde
NBT	Nitroblue-tetrazolium
ng	Nanograma
NNN	Meio de cultura Novy, Nicolle e McNeal
PCR	Polimerase Chain Reaction
PGM	Fosfoglucomutase
PKDL	Leishmaniose Dérmica pós Calazar
PVC LV	Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Rotação por minuto
TBS	Tris-Buffered-Saline
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 LEISHMANIOSES	14
1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL	17
1.2.1 Leishmaniose visceral zoonótica	17
1.3 EPIDEMIOLOGIA DA LVZ	19
1.4 DIAGNÓSTICO	20
1.4.1 Diagnóstico clínico	20
1.4.2 Diagnóstico laboratorial	21
1.4.2.1 <u>Testes sorológicos</u>	21
1.4.2.2 <u>Testes parasitológicos</u>	24
1.4.2.2.1 <i>Exame direto ou citológico</i>	24
1.4.2.2.2 <i>Cultura parasitológica</i>	25
1.4.2.3 <u>Histopatologia</u>	25
1.4.2.4 <u>Imuno-histoquímica</u>	26
1.4.2.5 <u>Técnica de hibridização in situ</u>	29
1.4.2.6 <u>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</u>	31
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	37
4.2 TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO IN SITU	38
4.2.1 Leitura das lâminas de hibridização in situ	39
4.3 REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE Qpcr	40
4.3.1 Extração e Purificação de DNA a partir de amostras parafinadas	40
4.3.2 Quantificação de DNA por fluorimetria	41
4.3.3 Protocolo de amplificação de DNA por PCR quantitativa	41
4.3.4 Teste da qualidade do DNA	42
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
4.5 ASPECTOS ÉTICOS	44
5 RESULTADOS	45
5.1 AVALIAÇÃO DA qPCR PARA <i>L. infantum</i>	45

5.2	VALORES DE SENSIBILIDADE DAS TÉCNICAS ISH E QPCR	47
5.3	CONCORDÂNCIA INTEROBSERVADORES NA TÉCNICA DE ISH	50
5.4	CARGA PARASITÁRIA DE L. infantum OBTIDA PELA qPCR EM CÃES POSITIVOS E NEGATIVOS PARA ESSE PARASITO NA TÉCNICA DE ISH.....	51
5.5	CARGA PARASITÁRIA DE L. infantum OBTIDA PELA qPCR EM CÃES COM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE SINAIS CLÍNICOS.....	52
5.6	CONCORDÂNCIA ENTRE AS TÉCNICAS.....	52
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são enfermidades parasitárias, distribuídas mundialmente, e que apresentam um grave impacto na saúde pública devido a sua grande expansão territorial e atual tendência de urbanização (WHO, 2018).

São doenças que se caracterizam por grande diversidade de manifestações clínicas e com sítios anatômicos de acometimento distintos, o que as classifica em três entidades principais: leishmaniose visceral (LV) que é a forma mais grave, com acometimento de diversos órgãos e com alta letalidade na ausência de tratamento; leishmaniose cutânea (LC) que é a forma mais frequente com desenvolvimento de lesões e úlceras de pele, e pode empreender condição difusa ou localizada; leishmaniose mucocutânea (LMC) com ocorrência mais restrita em regiões da América Latina, afetando inicialmente a pele e atingindo membranas mucosas do nariz, boca e garganta (STEVERDING et al., 20017; WHO, 2018). Em alguns países do leste da África e em determinadas regiões da Índia tem se descrito uma outra forma de manifestação da leishmaniose definida como leishmaniose dérmica pós calazar (PKDL). Este quadro se caracteriza pela ocorrência de sinais clínicos dermatológicos após um período de seis meses a um ano da suposta cura do calazar. Indivíduos com recidiva apresentam máculas pelo corpo e lesões nodulares ou em forma de pápulas, distribuídas principalmente na face, braços e tronco (WHO, 2018).

Nas Américas, as leishmanioses são classificadas em leishmaniose visceral americana (LVA) e leishmaniose tegumentar americana (LTA) (BRASIL, 2014). São doenças que apresentam um caráter social bastante relevante, pois podem infringir aos portadores das formas cutânea e mucocutânea problemas de ordem psicológica, devido às possíveis feridas desfigurantes naqueles que têm seu diagnóstico realizado tardiamente (PACE, 2014).

As leishmanioses são doenças transmitidas principalmente por vetores biológicos e causadas por mais de vinte espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, os quais pertencem a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (IMAN, 2009; WHO, 2010; WHO, 2018).

A identificação do parasita ocorreu no final do século XIX e início do século XX por cientistas, na grande maioria militares, de forma independente entre si. Em 1903, James Donovan evidenciou nos esfregaços esplênicos oriundos de material de necropsia, estruturas ovais com 2 a 3 µm de diâmetro, semelhantes às encontradas anteriormente em esfregaços de sangue de pacientes por Willian Boog Leishman, em 1900. A semelhança entre as duas informações permitiu que desconfiassem se tratar do mesmo agente etiológico causador da infecção (ROSS, 1913). O parasito recebeu o nome genérico de *Leishmania*, em referência a um dos cientistas envolvidos na descoberta.

As leishmanioses fazem parte de um grupo de doenças negligenciadas, sendo endêmicas em muitas áreas de regiões tropicais e subtropicais do Velho (Europa, Ásia e África) e do Novo Mundo (continente americano). Na Europa, a doença é endêmica nos países da Bacia do Mediterrâneo (GRADONI, 2017; ORYAN; AKBARI, 2016; WHO, 2018). Como definição, doenças negligenciadas são aquelas que prevalecem em regiões tropicais e subtropicais e devem ser notificadas. Afligem mais de 149 países e afetam mais de um bilhão de pessoas, consumindo bilhões de dólares por ano. A população destes países vive em condições de absoluta pobreza, sem saneamento básico e sob constante risco de adoecimento (WHO, 2018).

O grande número de espécies de *Leishmania* spp. descritos direcionou a classificação das espécies dentro de complexos, baseando-se em critérios imunológicos, bioquímicos e moleculares (CONCEIÇÃO-SILVA, 2014). No Velho Mundo prevalecem as espécies representantes do sub-gênero *Leishmania* representadas pelos complexos *L. donovani*, *L. major* e *L. tropica*. As espécies de *Leishmania* spp. presentes no Novo Mundo pertencem ao sub-gênero *Leishmania* que é representado pelo complexo *L. donovani* e *L. mexicana* ou ao sub-gênero *Viannia* representado pelos complexos *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (CONCEIÇÃO-SILVA, 2014; WHO, 2010).

Estes protozoários apresentam duas formas principais distintas: promastigota e amastigota. A forma promastigota é encontrada no trato digestivo do vetor flebotomíneo, enquanto que a forma amastigota está presente em hospedeiros vertebrados. As formas promastigotas são alongadas e apresentam um flagelo livre com um núcleo arredondado ou oval, localizados na região mediana da célula. Já as formas amastigotas apresentam forma ovoide ou circular, com flagelo interiorizado (CONCEIÇÃO-SILVA, 2014).

Os vetores biológicos envolvidos na transmissão das leishmanioses no mundo são insetos da ordem Diptera, Família Psychodidae, subfamília *Phlebotominae*, conhecidos como flebotomíneos. Nas regiões do Velho Mundo, os vetores são os flebotomíneos do gênero

Phlebotomus, enquanto que no Novo Mundo, os vetores são pertencentes ao gênero *Lutzomyia*. A ampla propagação e distribuição destes insetos determina a casuística de ocorrência das leishmanioses pelo mundo (ORYAN; AKBARI, 2016).

Os flebotomíneos são insetos silenciosos com 2-3 mm de comprimento que apresentam maior atividade de repasto sanguíneo durante o período crepuscular e noturno, geralmente em ambientes externos, embora algumas espécies prefiram os períodos mais iluminados do dia e ambientes fechados. Esta dessemelhança de condutas influencia nas metodologias aplicadas em seu controle (PACE, 2014). Durante o processo de alimentação, fêmeas de *L. longipalpis* infectadas com *Leishmania* spp. injetam saliva contendo substâncias vasodilatadoras e antiagregantes plaquetárias, além de substâncias inibidoras do sistema complemento que facilitam o estabelecimento da infecção em hospedeiros vertebrados (CAVALCANTE et al., 2003; RIBEIRO, 1987;). A presença de formas promastigotas da *Leishmania* spp. na região válvula faringiana do flebotomíneo dificultam a passagem do sangue necessário durante o repasto e desta forma colabora para que o hospedeiro vertebrado seja afligido por mais vezes favorecendo a infecção (PACE, 2014).

A sobrevivência da *Leishmania* spp. e a manutenção de seu ciclo depende estritamente da relação bem-sucedida entre o inseto vetor e o reservatório mamífero. Indivíduos com LC, PKDL e aqueles indivíduos infectados, porém refratários a doença, mantêm o ciclo antroponótico da enfermidade, comum em regiões situadas no Velho Mundo e com espécies de *Leishmania* restritas a estas regiões (PACE, 2014; WHO, 2018).

O ciclo infeccioso do vetor se inicia no momento do repasto sanguíneo das fêmeas em hospedeiros vertebrados (humanos e animais), onde ocorre a ingestão de macrófagos infectados com as formas amastigotas da *Leishmania* spp. Os macrófagos parasitados alcançam o trato digestivo anterior dos insetos, onde se rompem e liberam os parasitos, que iniciam o processo de reprodução por divisão binária, seguida da diferenciação em promastigotas. Estes se transformam em paramastigotas que colonizam esôfago e faringe do inseto vetor, sofrem nova diferenciação para forma promastigota metacíclica, que é a forma infectante do parasito (BRASIL, 2014; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012;).

Os hospedeiros vertebrados são contaminados por fêmeas infectantes durante o repasto sanguíneo, liberando as formas promastigotas metacíclicas. Estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocítico, ocorrendo novamente a diferenciação em formas amastigotas e iniciam o processo de reprodução contínua, até o momento em que são liberadas devido a exaustão do macrófago e seu rompimento (BRASIL, 2014).

1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV é uma doença sistêmica com envolvimento de células do sistema mononuclear fagocitário, sendo os órgãos mais afetados o baço, fígado, linfonodos, medula óssea e pele. Em casos mais avançados pode ocorrer o acometimento generalizado de órgãos e tecidos (MAIA; CAMPINO, 2008; WHO, 2010). Apresenta ampla distribuição geográfica, com ocorrência em áreas tropicais e subtropicais. Endêmica em 56 países, sendo que somente sete respondem por 90% dos casos relatados: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2018). No continente Americano, o Brasil concentra a maioria dos casos, com ocorrência inicialmente em áreas silvestres e rurais e posteriormente se difundindo para centros urbanos (BRASIL, 2014). É agrupada em duas categorias de acordo com o tipo de transmissão: antroponótica e zoonótica (WHO, 2010). A LV antroponótica ocorre em humanos da Índia, Bangladesh, Nepal e África. Ela é causada pelo protozoário *L. donovani* e é transmitida entre humanos pela picada de flebotomíneos vetores. Por sua vez, a leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) que acomete humanos, além de mamíferos domésticos e silvestres, é causada pelo protozoário *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) e transmitida entre humanos e animais principalmente pela picada de flebotomíneos vetores.

1.2.1 Leishmaniose visceral zoonótica

No Brasil, é considerada como a antroponose de maior importância em saúde pública, estando presente em todos os estados (WHO, 2010; BRASIL, 2018). É uma doença crônica, grave e de alta letalidade, podendo em casos não tratados ter mortalidade de 70 a 90% em humanos (WHO, 2010).

O principal vetor biológico da LVZ no Brasil é o inseto flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Em algumas áreas da região Centro-Oeste do Brasil já foi relatada a participação da espécie *Lutzomyia cruzi* neste ciclo. No meio silvestre, animais como raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) têm sido descritos como reservatórios, enquanto que no meio urbano o cão é a principal fonte de infecção para o vetor (BRASIL, 2014).

Embora a principal forma de infecção de cães pela *L. infantum* seja através da picada do vetor flebotômico, modelos de transmissão não-vetorial foram descritos, porém com papel ainda não esclarecido no comportamento natural e epidemiológico da doença. Dentre estas formas pode se enquadrar a infecção por meio de subprodutos de sangue infectados, transfusão sanguínea, transmissão venérea e de forma vertical por meio de contágio materno-fetal. Formas suspeitas de infecção podem ocorrer entre cães por meio de mordidas e contágio com feridas infectantes (PALTRINIERI et al., 2016; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Em cães, a LVZ tem um curso lento e crônico, com apresentação de sinais clínicos relacionados ao padrão imunológico individual do animal. A maioria dos animais apresenta respostas de anticorpos imediatamente após o primeiro contato com a infecção e se tornam refratários ou suscetíveis ao progresso da infecção dependendo da resposta imunológica desenvolvida (PALTRINIERI, 2016). Indivíduos que desenvolvem a doença apresentam nas fases mais avançadas da infecção sinais clínicos tais como linfadenomegalia, esplenomegalia, onicogribose, acometimento da pele caracterizado por alopecia, dermatites e úlceras, além de apatia, rinorréia e ceratoconjuntivite. O animal pode apresentar eventos diarreicos, hemorragia intestinal, edema de membros locomotores, vômito e hiperqueratose. A evolução clínica da doença acarreta paresia dos membros posteriores, inanição, caquexia, acometimento renal, epistaxe, sinais neurológicos e morte (ALMEIDA et al., 2005; BRASIL, 2014; DEANE E DEANE, 1955; MARZUCH et al., 1985; MELÉNDEZ-LAZO et al. 2018).

Infecções por *L. infantum* frequentemente seguem um padrão crônico e insidioso de acometimento onde a infecção pelo parasito nem sempre predispõe ao surgimento de sinais clínicos imediatos, o que favorece a manutenção da infecção subclínica em muitos indivíduos (BRASIL, 2014; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

A determinação do estágio da doença em cães é obtida por meio de avaliação clínico-laboratorial, além das anormalidades patológicas apresentadas, o que torna o diagnóstico bastante complexo, classificando os cães em quatro estágios: O primeiro estágio engloba os animais expostos, com diagnóstico parasitológico negativo e baixos títulos de anticorpos. São clinicamente sadios ou com sinais clínicos associados a outras doenças. Avaliação molecular por meio da técnica de PCR apresenta resultado negativo, bem como na citologia; O segundo estágio compreende os cães infectados, sem sinais clínicos, com perfil hematológico normal e discretas alterações bioquímicas, porém com PCR e citologia positiva em aspirados da medula óssea, baço, linfonodo e pele. Neste grupo se incluem animais com presença de comorbidades associadas, doenças neoplásicas, desordens metabólicas, dentre outras

patologias , além da refratividade a tratamentos antileishmaniais; O terceiro estágio representa os cães doentes com presença de sinais clínicos característicos da LVZ e diagnóstico histológico típico da infecção; O quarto estágio enquadra os cães com condições clínicas graves e comprometimento de sistemas fisiológicos importantes, principalmente o renal, além de outros partilhados também por distintas enfermidades (PALTRINIERI et al., 2010, 2016).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DA LVZ

A LVZ é endêmica em países da América Latina, Ásia, África e Europa (Bacia do Mediterrâneo). No Brasil, dados do Ministério da Saúde (MS) durante o período de 1990 a 2016 relataram a ocorrência de 84.922 casos de LVZ em humanos, com incremento da letalidade de 3,2% em 2000 para 7,4% em 2016, com o registro de 265 óbitos (BRASIL, 2018). No período entre 2012 a 2016, foi registrada uma média anual de 3.247 casos humanos, com maior prevalência na região Nordeste. Nos anos de 2014 a 2016, a região Sudeste superou a região Norte em número de casos humanos de LVZ, assumindo a segunda posição no quadro de distribuição da doença (BRASIL, 2018).

O desmatamento e a construção de residências próximas a florestas propiciaram a adaptação dos flebotômíneos ao domicílio e proximidades, e também do parasito a novos vetores e hospedeiros reservatórios. Este cenário intensificou a transmissão da leishmaniose entre animais domésticos e humanos, levando a urbanização da doença no Brasil (BRASIL, 2014; WHO, 2010).

No Brasil, o MS recomenda a eutanásia a todos os cães que apresentem resultados positivos em testes sorológicos e/ou parasitológico para *L. infantum* como forma de limitar o ciclo de transmissão da doença. Entretanto, esta medida ainda é bastante controversa pois apresenta pouca efetividade na diminuição da incidência da doença em cães e em humanos, e um dos fatores que pode estar relacionado ao baixo impacto destas ações é a acurácia limitada dos testes realizados em cães com LVZ (ARRUDA et al., 2013). Desta forma a utilização de métodos com maior sensibilidade e especificidade para seleção destes animais é imprescindível para que as ações sejam mais efetivas e minimize a incidência de resultados falso-positivos e falso-negativos (BRASIL, 2014).

A prevalência da infecção em cães em áreas endêmicas é alta, podendo chegar a 50% ou mais, porém a prevalência da doença é de 3% a 10%, o que demonstra que a maioria dos cães infectados não apresenta sinais clínicos, dificultando o diagnóstico (NOGUEIRA et al., 2009). Portanto, uma variedade de testes laboratoriais tem sido empregada na detecção da infecção por *L. infantum* em cães, embora a sensibilidade varie consideravelmente, limitando o diagnóstico principalmente em animais com ausência de sinais clínicos (FERREIRA et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2010; GOMES et al., 2008; GRIMALDI et al., 2012; SCHUBACH et al., 2014). Cães vacinados contra LVZ em áreas endêmicas podem apresentar resultados falso-positivos quando submetidos aos métodos sorológicos de diagnóstico comumente utilizados (MARCONDES et al., 2013), bem como a diversidade de manifestações clínicas nos quadros LVC. Desta forma, a aplicação de novas técnicas de diagnóstico é necessária para melhorar a acurácia na identificação da infecção em cães com *L. infantum*.

1.4 DIAGNÓSTICO

1.4.1 Diagnóstico clínico

A LVZ é uma doença na qual a infecção nem sempre se manifesta como doença clínica devido a elevada prevalência de infecções subclínicas, que podem ser autolimitantes ou avançar para quadros graves da doença, chegando a fatalidade. Os principais achados durante anamnese em cães com suspeita de LVZ incluem lesões oculares e na pele, linfadenomegalia localizada ou difusa, emagrecimento, apatia, anorexia, letargia, esplenomegalia, hepatomegalia, poliúria, polidipsia, epistaxe, onicogribose, poliartrite, vômito, hipertermia e diarreia. O envolvimento de lesões dermatológicas em cães com suspeita de leishmaniose é elevado, variando de 56 a 90%, e podem ser os únicos sinais da doença (DE CARVALHO et al, 2018).

A ausência de testes laboratoriais de referência para o diagnóstico da LVZ com 100% de sensibilidade e especificidade para comparação com os testes auxiliares de diagnóstico é o maior obstáculo para o aprimoramento das técnicas diagnósticas para LVZ, já que estes possibilitariam a determinação das vantagens e limitações das técnicas diagnósticas utilizadas, propiciando desta forma uma melhor proposta diagnóstica (SOLANO-GALLEGO et al., 2014).

1.4.2 Diagnóstico laboratorial

Análises laboratoriais são realizadas com o objetivo de confirmar a infecção em cães com *L. infantum*. Diversas metodologias investigativas podem ser adotadas visando a detecção do parasita (testes diretos) ou de componentes da resposta imune dos indivíduos infectados, como a produção de anticorpos específicos (testes indiretos) (SCHUBACH et al., 2014). A positividade nos testes indiretos (ex: sorologia), pode ou não indicar infecção atual ou ativa. Por sua vez, a positividade nos testes diretos (citologia, histopatologia, imunohistoquímica, hibridização in situ, PCR, cultura, xenodiagnóstico) detectam infecção ativa (PALTRINIERI et al., 2016). Os principais testes de diagnóstico laboratorial da infecção por *L. infantum* em cães são descritos a seguir.

1.4.2.1 Testes sorológicos

Métodos sorológicos são as mais comuns técnicas para o diagnóstico da LVZ e tem como fundamento a detecção de anticorpos específicos da classe IgG anti-*Leishmania* no soro de cães suspeitos (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2014). Os principais testes são representados pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (EIE) e testes imunocromatográficos (ICT). No Brasil, o programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral (PVC-LV) recomenda o teste imunocromatográfico rápido *Dual-path platform technology* (DPP®-RT) como técnica de

triagem, seguido pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA *do inglês* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de forma confirmatória. O ICT utilizado no Brasil é o DPP®-RT produzido por Biomanguinhos/Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), que utiliza a combinação dos antígenos recombinantes rK9, rK26 e rK39 do *L. infantum*, constituindo o antígeno rK28 (SCHUBACH et al., 2014; BRASIL, 2014). A eutanásia é recomendada se ambas as técnicas forem positivas (ARRUDA et al., 2016; BRASIL, 2014). Estas técnicas apresentam praticidade e rapidez durante o processo de coleta das amostras e permitem identificar cães soropositivos em inquéritos epidemiológicos com grande número de amostras. Os resultados são dados de forma qualitativa (DPP®-RT) e quantitativa pela análise do título final (IFI) ou leitura da densidade óptica da amostra (ELISA) (PALTRINIERI et al., 2016; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Muitos antígenos recombinantes de *L. infantum* têm sido avaliados para o diagnóstico LVZ, visando melhora na acurácia dos testes sorológicos em comparação aos antígenos brutos. Em geral, a maioria destes métodos apresenta adequada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico das leishmanioses na dependência do antígeno que está sendo utilizado. O extrato total do parasita apresenta alta sensibilidade quando utilizado para detecção de infecções subclínicas ou clínicas, porém apresentam uma menor especificidade. Em contrapartida, ensaios que utilizam antígenos proteicos recombinantes são mais específicos, porém, podem ter pouca sensibilidade para detecção de cães infectados clinicamente saudáveis, dependendo do antígeno empregado. As principais proteínas recombinantes relatadas por ter maior sensibilidade na detecção da infecção em cães são a K39, K26, KMP11, SMT, cisteína proteinase, A2 e a proteína quimérica Q, além do extrato ribossomal proteico do parasita. A frequência de reações cruzadas com outros patógenos é possível de ocorrer em alguns testes sorológicos dependendo do tipo de antígeno utilizado, principalmente com aqueles que utilizam o parasita inteiro, diferente do que ocorre quando se utiliza peptídeos recombinantes, extratos e extratos proteicos ribossomais onde esta situação é menos provável. (TRAVI et al, 2018). Recentemente estudos realizados com o antígeno recombinante K28 (rK28), revelou sensibilidade e especificidade de 100%, superando o antígeno rK39 (VENTURIN et al., 2015).

Os testes ICT se distinguem pela presença de simples ou múltiplas combinações de antígenos de *Leishmania* spp. e podem utilizar apresentações distintas de sangue como soro, plasma ou sangue total em sua metodologia, provendo resultados qualitativos caracterizados

pela presença ou ausência de bandas ou pontos cromatógenos definidos (GRIMALD-JR et al., 2012; PALTRINIERI et al., 2016; SCHUBACH et al., 2014).

O DPP®-RT para o diagnóstico da LVZ apresentam sensibilidade variando de 47% a 98% e especificidade de 61,1% a 96%. Tais variações estão relacionadas diretamente a apresentação de sangue utilizada durante a testagem, bem como ao *status* clínico do animal no momento em que foi avaliado (DE CARVALHO et al., 2018; GRIMALD-JR et al., 2012; SCHUBACH et al., 2014; SILVA et al., 2011).

Animais que apresentam resultados positivos para ICT são submetidos a sorologia quantitativa através das metodologias de ELISA ou IFI para confirmar o diagnóstico. Resultados negativos pelo ICT também deverão ser confrontados com metodologias quantitativas (PALTRINIERI et al., 2016).

O IFI para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em cães apresenta sensibilidade e especificidade próximas de 100%, porém apresenta reações falso positivas em área endêmica para *Trypanosoma cruzi* que apresenta similaridade filogenética com *L. infantum* (ARRUDA et al., 2013) e com *Trypanosoma caninum* isolado de pele íntegra de cães saudáveis (MADEIRA et al., 2009) limitando assim a sua utilização (PALTRINIERI et al., 2016; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Apresenta como desvantagem em relação ao ELISA a dependência intrínseca pelo operador na sua capacidade de identificar a forma promastigota em microscopia específica (PALTRINIERI et al., 2016).

A técnica de ELISA permite a triagem de grande número de amostras utilizando microplacas sensibilizadas com antígeno de *Leishmania* spp. Com o auxílio de espectrofotômetro são determinados os títulos de anticorpos através da densidade ótica. Portanto, é uma técnica que possui como vantagens em relação a IFI a pouca interferência do operador na produção de viés, bem como a possibilidade de combinações de múltiplos antígenos que aumentam a sensibilidade e especificidade do método (PALTRINIERI et al., 2016; TRAVI et al., 2018).

Quando ambas as técnicas são confrontadas, independente dos antígenos utilizados (*L. major-like* e *L. infantum*) verificou-se sensibilidade da IFI variando entre 60 a 73%, com especificidade de 77 a 96%, enquanto que o ELISA apresentou sensibilidade entre 93 e 100% e especificidade entre 87 e 92% (SILVA et al., 2013). Mello et al. (2014) relataram sensibilidade superior a 90% para as técnicas de DPP®-RT e ELISA utilizadas quando comparadas às culturas do parasito definidas como referência.

Há indícios de que a ocorrência de resultados falso-negativos exibidos nas técnicas sorológicas podem estar relacionados ao período pré-patente da infecção ou pela ausência de soroconversão em alguns indivíduos afetados (PARANHOS-SILVA et al., 1996).

1.4.2.2 Testes parasitológicos

1.4.2.2.1 *Exame direto ou citológico*

O exame parasitológico direto objetiva a visualização de formas amastigotas do parasita, sendo realizado um *imprint* em lâminas de vidro por aposição do material coletado que serão submetidas à coloração pelas técnicas de Giemsa e Leishman ou panótico rápido. É uma técnica que apresenta baixo custo, praticidade e rapidez (BRASIL, 2014).

Amostras de variados tecidos e fluídos corporais podem ser utilizadas, desde que o animal apresente alguma característica clínica ou laboratorial que defina a suspeita de leishmaniose. Situações onde há suspeita da infecção, porém com ausência de lesões típicas, faz-se a opção por outros sítios de coleta como a medula óssea, linfonodos e baço (GONTIJO; MELO, 2004; PALTRINIERI et al., 2016).

A citologia precisa a forma amastigota da *Leishmania* spp. no interior do macrófago ou livre em esfregaços corados. Lesões cutâneas ulceradas com necrose e restos celulares, além de contaminação bacteriana, podem mascarar os resultados na técnica. A visualização da forma amastigota define o diagnóstico, porém algumas vezes é necessário recorrer às técnicas confirmatórias mais sensíveis (PALTRINIERI et al., 2016).

A citologia tem especificidade em torno de 100% e a sensibilidade varia em função do tempo gasto na busca do parasita, variando em torno de 80% em cães com presença de sinais clínicos da doença e menor em cães soropositivos, porém subclínicos para doença (BRASIL, 2014).

1.4.2.2.2 *Cultura parasitológica*

O diagnóstico conclusivo da infecção ativa por *Leishmania* spp. pode ser obtido por meio da cultura parasitológica. Esta técnica também permite avaliar a viabilidade do parasito (BRASIL, 2014).

Na cultura parasitológica as amostras obtidas por meio de biópsia ou de punção são semeadas em meio de cultura bifásico Novy-Neal-Nicolle e meio Schneider's *Drosophila* contendo 10% de soro fetal bovino, com resultados satisfatórios após aproximadamente quatro semanas da semeadura (DE ALMEIDA et al., 2011).

A caracterização dos parasitos é realizada utilizando a técnica de eletroforese *multilocus* com utilização de seis sistemas enzimáticos: G6PDH (Glicose-6 fosfato-desidrogenase), IDH-NADP (Isocitrato desidrogenase), MDH (Malato desidrogenase), ME (Enzima Málica), PGM (Fosfoglucomutase) e 6PG (6Fosfogluconato desidrogenase) (CUPOLILLO et al., 1994; MADEIRA et al., 2009).

A cultura parasitológica, seguida de especiação pela técnica de eletroforese enzimática *multilocus*, é o método de referência para identificação de *Leishmania* spp. a nível de espécie, com sensibilidade variando entre 62,1% e 82,2% e especificidade próxima a 100% (BRASIL, 2014; FURTADO et al., 2015; MADEIRA et al., 2009).

As desvantagens desta técnica são a demora para obtenção dos resultados e a suscetibilidade à contaminação microbiana, além da ausência de desenvolvimento do parasito em alguns isolados (FURTADO et al., 2015; MAIA et al., 2008).

1.4.2.3 Histopatologia

Seguindo os procedimentos de necropsia e biópsia de pele, as amostras teciduais são coletadas e processadas para fixação em solução de formalina 10% durante um período máximo de 36 horas e emblocadas em parafina. O passo seguinte é o preparo das lâminas que serão submetidas a colorações específicas, de acordo com o protocolo solicitado (PALTRINIERI et al., 2016; QUEIROZ et al., 2011).

A histopatologia (HP) permite demonstrar a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. nos tecidos com auxílio de coloração de rotina com os corantes hematoxilina-eosina (HE). Apresenta como desvantagens o longo período de execução e a maior dificuldade em localizar as formas amastigotas, se comparado a técnica de citologia. Apresenta como vantagem a caracterização do padrão arquitetônico celular das lesões e sua correlação com o grau de infecção do animal. Alguns protocolos de pesquisa sugerem a execução obrigatória da histopatologia (HP) na investigação de casos de leishmaniose (PALTRINIERI et al., 2016; QUEIROZ et al., 2011).

A visualização do parasito nos tecidos é importante, pois permite a correlação da quantidade dos parasitos com as lesões associadas e quantificação da carga parasitária (QUEIROZ et al., 2011). Embora os macrófagos possam albergar alta quantidade de formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* spp. em lesões inflamatórias, a densidade parasitaria pode ser baixa, mesmo em órgãos onde a carga parasitária geralmente é elevada como linfonodos, baço, medula óssea, pele e fígado. Adicionalmente, é relevante considerar que a presença do parasito infectando os tecidos em casos de LVZ pode divergir em função do estado imunológico do animal, condição clínica e submissão a tratamentos anteriores (TOPLU; AYDOGAN, 2011).

As principais lesões histológicas encontradas na LVZ se caracterizam por hipertrofia e hiperplasia de células do sistema fagocítico mononuclear, reações inflamatórias granulomatosas no baço, linfonodos, medula óssea e fígado, além da inflamação crônica na pele (TOPLU; AYDOGAN, 2011).

Os valores de sensibilidade descritos por diferentes autores para técnica de HP na LVC variam de 17 a 64% (ALVES et al., 2013; MENEZES et al., 2013; QUEIROZ et al., 2011).

1.4.2.4. Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) surgiu com as pesquisas em imunopatologia em meados do século 20 com a introdução da técnica de marcação de anticorpos utilizando compostos fluorescentes a fim de detectar antígenos teciduais (BRASILEIRO FILHO, 2016), porém somente em 1974, a utilização da enzima imunoperoxidase permitiu a detecção de

alguns antígenos tissulares em tecidos FFEP, sendo a partir daí incluído na rotina histopatológica (FERRO, 2013).

A IHQ é definida como técnica imunológica essencialmente qualitativa que utiliza anticorpos como reagentes específicos que permitem a localização topográfica de proteínas e antígenos de qualquer natureza em tecidos processados através de metodologias histopatológicas (BRASILEIRO FILHO, 2016; RAMOS-VARA, 2005), se fundamentando como uma técnica complementar ao diagnóstico da leishmaniose por detectar proteínas do parasito em amostras teciduais, inclusive em macrófagos (AMATO et al., 1998; RAMOS-VARA, 2005).

O produto da ligação antígeno-anticorpo em presença de um sistema de detecção imunofluorescente ou imunoenzimático, permite a visualização desta interação ao microscópio de fluorescência ou microscópio óptico (FERRO, 2013; RAMOS-VARA, 2005). Importante ressaltar que o produto da reação IHQ deve sempre ser interpretado em conjunto com as alterações e achados morfológicos identificados (BRASILEIRO FILHO, 2016).

Os anticorpos utilizados na reação de IHQ podem ser monoclonais ou policlonais, e obtidos através da purificação de anticorpos primários ou mesmo obtidos de animais previamente imunizados (BRASILEIRO FILHO, 2016). O desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos para vários antígenos tissulares ou celulares e o advento da técnica de recuperação antigênica foram fatores preponderantes para evolução da HIQ (FERRO, 2013).

O poder da marcação depende, além da qualidade dos anticorpos, da fixação e processamento da amostra, da etapa de recuperação antigênica e da sensibilidade do sistema de detecção (MATOS et al., 2010).

As reações presentes na técnica de IHQ são representadas pela técnica de imunofluorescência que pode ser direta e indireta, dependendo da ordem em que a substância fluorescente é ligada e por técnicas imunoenzimáticas. Na imunofluorescência direta, o composto fluorescente é ligado imediatamente ao anticorpo primário enquanto que na imunofluorescência indireta o anticorpo primário se liga ao antígeno de interesse e a substância fluorescente é conjugada a um anticorpo secundário que se ligará ao primário e com ele forma a reação específica que serão examinadas em microscopia de fluorescência. Metodologias que utilizam a imunofluorescência indireta são mais específicas pois a reação de imunofluorescência exibe maior intensidade (BRASILEIRO FILHO, 2016).

As metodologias imunoenzimáticas tem como principais representantes a enzima peroxidase, substâncias cromógenas como a tetra-hidrocloro de 3,3 diaminobenzidina

(DAB) que é o substrato mais usado e gera a coloração marrom-escura no sítio da reação, além da composição peroxidase-antiperoxidase (PAP) e do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC). Como na técnica de imunofluorescência, as enzimas podem ser acopladas tanto no anticorpo primário, quanto no secundário (BRASILEIRO FILHO, 2016).

O primeiro composto conjugado com um anticorpo foi o isocianato de fluoresceína, seguido do isotiocianato de fluoresceína (FITC). Outros compostos para conjugação foram surgindo como as enzimas *horseradish* peroxidase (HRP) e fosfatase alcalina (FERRO, 2013).

O processo de fixação do tecido se configura na etapa mais importante das técnicas histopatológicas, pois favorece a preservação, estabilização e proteção dos cortes histológicos. O uso do formaldeído neste processo é bastante frequente, embora o mesmo promova alterações na estrutura conformacional de determinadas moléculas, principalmente nas proteínas que expressam os epítomos antigênicos. A IHQ permite o uso de preparações de tecido FFEP e de amostras congeladas e se apresenta como uma ferramenta ideal para estudos retrospectivos (FERRO, 2013; TOPLU; AYDOGAN, 2011).

A etapa de condicionamento celular por ação de altas temperaturas e de enzimas proteolíticas revertem a ação do formaldeído nestas regiões, possibilitando a ligação dos anticorpos aos antígenos tissulares. Etapa também conhecida como recuperação antigênica (FERRO, 2013). É uma técnica que se caracteriza como ferramenta suplementar das mais fundamentadas para confirmação dos resultados da técnica de HP com coloração pela HE, pois apresenta maior sensibilidade na detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. (ALVES et al., 2013; QUEIROZ et al., 2011; TOPLU; AYDOGAN, 2011), porém ainda apresenta como contraponto a falta de anticorpos purificados anti-*Leishmania* spp. para identificação da espécie (DINHOPL et al., 2011).

Assim como a HP e o exame citológico direto, a IHQ não permite a identificação da *Leishmania* spp envolvida na infecção. Muitas vezes reações cruzadas são observadas, principalmente com *Histoplasma* spp., *Paracoccidioides* spp. e *Trypanosoma* spp. (ALVES et al., 2013; QUINTELLA et al., 2009; SALINAS et al., 1989).

Por se tratar de uma técnica no qual a avaliação morfológica é primordial, o processo de coloração pela HE deve ser adequado pois o diagnóstico se sustenta nos achados de estruturas assemelhadas em forma e tamanho às amastigotas.

A sensibilidade da técnica de IHQ no diagnóstico da LVC varia de 44,4% a 86,6% (KENNER et al., 1999; MENEZES et al., 2013; QUEIROZ et al., 2011; TOPLU; AYDOGAN, 2011; XAVIER et al., 2006) aliada a alta especificidade, define a IHQ como

método diagnóstico eficaz na detecção de *Leishmania* spp. na pele de cães com infecção subclínica (QUEIROZ et al., 2011).

1.4.2.5 Técnica de hibridização *in situ*

A técnica de hibridização *in situ* (ISH), desenvolvida no final da década de 1960 (Gall et al., 1969), ainda é pouco utilizada devido ao alto custo em medicina humana e veterinária para a identificação histológica de patógenos como vírus, bactérias e protozoários (MAES et al., 2014). Entretanto, foi introduzida recentemente como técnica de diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães (DINHOPL et al., 2011; FURTADO et al., 2015; MENEZES et al., 2013). A ISH combina biologia molecular com HP e geralmente é aplicada em tecidos FFEP (MAES et al., 2014), e em tecidos congelados, da mesma forma que a IHQ (NITTA et al., 2003).

Segundo Nitta et al. (2003), as amostras de pele FFEP quando comparadas às amostras congeladas para realização da ISH apresentam as seguintes vantagens: preservação ideal da morfologia tecidual, facilidade na preparação do corte histológico e prescindir do uso de nitrogênio líquido e frio. O objetivo da ISH é detectar o agente infeccioso, demonstrando a presença de segmentos específicos de seus ácidos nucleicos (DNA ou RNA) na amostra tecidual (SEGALÉS et al., 1999). Para realização da técnica é preciso um molde de ácido nucleico (DNA ou RNA) no interior do tecido a ser testado (ácido nucléico alvo), uma sonda de ácido nucléico (DNA ou RNA) radioativamente ou quimicamente marcada, e um sistema de detecção para demonstrar a reação de hibridização (SEGALÉS et al., 1999).

De acordo com Maes et al. (2014), as sondas radioativas são mais específicas, porém as sondas quimicamente marcadas com digoxigenina, biotina, dinitrofenol (DNP) ou fluorescência produzem resultados mais rápidos e são mais seguras ao manuseio. A ISH com a utilização de sondas marcadas com fluorescência é denominada de fluorimétrica ou FISH e é mais indicada para o exame direto de amostras microbiológicas ou citológicas usando microscopia de fluorescência ou focal. Por sua vez, a ISH realizada com o uso de sondas quimicamente marcadas é denominada de colorimétrica ou CISH, sendo a leitura do exame

realizada em microscopia óptica. As sondas marcadas com digoxigenina ou DNP possuem a vantagem de que a sua detecção por anticorpos não possui reatividade cruzada com tecidos de animais e podem ser visualizadas usando um cromógeno como nitroblue-tetrazolium (NBT), similar a técnica de IHQ.

Comparadas às sondas de RNA, as sondas de oligonucleotídeos (DNA) possuem menor número de nucleotídeos, são mais estáveis e fáceis de trabalhar por resistirem à degradação pela enzima RNase (MAES et al., 2014). A boa sensibilidade das sondas de oligonucleotídeos é devido ao fato de serem desenhadas para genes alvos com múltiplas cópias no genoma. Para o diagnóstico da *Leishmania* spp. por CISH, as principais sondas utilizadas possuem como alvo o gene 5.8S do RNA ribossomal (5.8S rRNA) ou o gene do minicírculo do cinetoplasto (kDNA) (MENEZES et al., 2013).

Por meio da utilização de um protocolo automatizado em amostras de pele íntegra de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, as sensibilidades da técnica de ISH usando sonda inespecífica para o gênero *Leishmania* e sonda específica para *L. infantum* foram de 70.6% e 74.5% (MENEZES et al., 2013). A especificidade dessas duas sondas foi 100% e não houve hibridização cruzada com fungos patogênicos e protozoários (MENEZES et al., 2013). No mesmo estudo, a sensibilidade da IHQ foi 69.5%, bem semelhante a obtida pela ISH.

Furtado et al., (2015) analisaram amostras de pele íntegra, baço, medula óssea e linfonodo de 65 cães soropositivos para *L. infantum* pelas técnicas de DPP e ELISA. As técnicas de ISH automatizada com sonda específica para *L. infantum*, cultura parasitológica e IHQ foram comparadas. Os autores encontraram uma frequência de positividade total de 68,1% para ISH, maior que a cultura parasitológica (65.8%) e inferior a IHQ (70.0%). No linfonodo e baço, a ISH apresentou a sua maior frequência de positividade (83,1 % para baço e 83,1% para linfonodo), que foi superior à da IHQ (81,5% para baço e 81,5% para linfonodo) e cultura parasitológica (80,0% para baço e 72,3% para linfonodo). Entretanto, na pele, a frequência de positividade foi 47,7%, inferior a cultura parasitológica (56,9%) e IHQ (52,3%). A automação da ISH confere rapidez, consistência, reprodutibilidade, confiabilidade e adequabilidade no estudo de diversos tecidos, culminando com um aumento da capacidade de produção, quando comparado ao protocolo semi-automatizado (NITTA et al., 2003).

A ISH automatizada ainda não está difundida no Brasil, sendo realizada em raros centros de diagnóstico e pesquisa. Uma alternativa é a ISH em um protocolo semi-automatizado, que possui custo mais baixo e também confere bons resultados. A ISH semi-automatizada usando sonda específica para *L. infantum* já foi testada com êxito no diagnóstico da infecção por esse protozoário em amostras do trato genital de caninos por Boechat et al.

(2016). Os autores relataram uma frequência de positividade de 35% nos testículos e 5% no útero, semelhantes às frequências de positividade obtidas pela IHQ que foi de 40% nos testículos e 5% no útero. A ISH usando sonda específica para *L. infantum* em protocolo semi-automatizado também foi capaz de detectar formas amastigotas de *L. infantum* em cérebro e medula espinhal de cães naturalmente infectados (OLIVEIRA et al., 2017).

A principal vantagem da ISH, quando comparada às outras técnicas anteriormente citadas, é a visualização simultânea das formas amastigotas no tecido e a especiação delas como *L. infantum* devido ao uso de sonda específica (MENEZES et al., 2013). Apresenta como desvantagens o elevado período de execução, o maior custo quando comparado a IHQ e HP e a sensibilidade inferior à PCR em amostras congeladas (BOECHAT et al., 2016; CAMPOS et al., 2017; MENEZES et al., 2013; TRAVI et al., 2018). Essa menor sensibilidade da ISH em FFEP comparada à PCR em amostras teciduais congeladas, apesar da ISH ser também uma técnica molecular, é que ela não amplifica os ácidos nucleicos existentes nas amostras como faz a PCR e sim detecta fragmentos de ácidos nucleicos já existentes. Segundo Maes et al. (2014), a ISH usando sonda marcada com digoxigenina geralmente possui capacidade limitada para detectar concentrações do ácido nucleico alvo que são amplificadas pela técnica de PCR em até 25 ciclos.

1.4.2.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica de PCR baseia-se na amplificação de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) na amostra biológica visando a sua detecção. É uma técnica muito utilizada e considerada a mais sensível no diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães (TRAVI et al., 2018).

Diversas metodologias da técnica de PCR são utilizadas no diagnóstico de *L. infantum* em cães, onde destacamos o PCR convencional (cPCR), nested PCR e PCR quantitativa (qPCR) também denominado como PCR em tempo real (TRAVI et al., 2018).

A sensibilidade analítica dos testes moleculares sugere que eles têm poder de detectar entre 0,001 e 0,1 parasita/reacção, demonstrando ser uma excepcional ferramenta diagnóstica em áreas com baixa endemicidade e maior frequência de indivíduos assintomáticos (CAMPOS et al., 2017; TRAVI et al., 2018).

A extração do DNA pode ser realizada a partir de tecidos fresco, fluidos biológicos e células em cultivo (ALBUQUERQUE et al., 2017; DE CARVALHO et al., 2018; PALTRINIERI et al., 2016; QUEIROZ et al., 2011; TRAVI et al., 2018), além de tecidos FFEP, que precisam de protocolo diferenciado (BOECHAT et al., 2016; CAMPOS et al., 2017; MÜLLER et al., 2015). De modo geral, amostras de tecido congelado apresentam um DNA mais preservado, o que propicia uma maior quantidade de material amplificado, além da possibilidade de obtenção de fragmentos de maior tamanho, oposto ao que ocorre com amostras FFEP que podem apresentar DNA degradado ou com impurezas, com fragmentos de 300 a 400 pares de base (CAMPOS et al., 2017; MAES et al., 2014; MÜLLER et al., 2015).

Alguns relatos demonstram que as amostras FFEP estocadas por longo período e que apresentam baixa carga parasitária podem propiciar resultados falso-negativos devido a degradação do DNA. O tipo de fixador utilizado no processamento da amostra também constitui um fator que pode prejudicar os resultados da técnica por favorecerem a fragmentação do DNA e promoverem ligação cruzadas entre proteínas e ácidos nucleicos (CAMPOS et al., 2017; FRICKMANN et al., 2013; GILBERT et al., 2007; MAES et al., 2014;). O tempo recomendado para fixação da amostra em formalina neutra tamponada a 10% deve ser de 12 a 36 horas. A etapa seguinte de emblocamento em parafina também influencia na qualidade do DNA da amostra, devendo ser utilizada uma parafina sintética de boa qualidade à 60°C (CAMPOS et al., 2017; MAES et al., 2014).

Campos et al. (2017) verificaram por meio da técnica de qPCR que amostras de pele íntegras congeladas apresentaram sensibilidade de 100% e especificidade de 48,6%, enquanto que as amostras FFEP apresentaram 63,6% e 77,1%, respectivamente, confirmando a superioridade do material congelado para este tipo de análise.

Algumas dificuldades relacionadas à amplificação do DNA pela PCR podem ser ocasionadas pela presença de inibidores da enzima DNA polimerase e ao pequeno número inicial de moléculas contendo sequências alvos com integridade suficiente para a reação de amplificação. O desenvolvimento de *primers* específicos direcionados à detecção de α -actina em amostras permite uma pré-testagem desta amostra de DNA, verificando a sua disponibilidade para técnica (MÜLLER et al., 2003).

Ramos et al. (2012) compararam a sensibilidade entre cPCR e qPCR para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. em cães. Ambas as técnicas utilizaram três tipos de amostras biológicas congeladas (medula óssea, baço e linfonodo) em grupos de cães definidos como oligossintomáticos, polissintomáticos e assintomáticos. O estudo demonstrou que as sensibilidades da qPCR nas três amostras estudadas variaram de 83,3% a 100%,

enquanto que as sensibilidades da cPCR variaram de 0,0% a 66,6%. A sensibilidade mais alta da cPCR foi observada em cães polissintomáticos, diferentemente da qPCR que obteve 100% de sensibilidade nas amostras de animais assintomáticos. Em ambas as técnicas, o linfonodo foi o tecido que apresentou sensibilidade mais alta, contrapondo a medula óssea que obteve os valores menores de sensibilidade, principalmente pela técnica da qPCR.

Outros estudos utilizando tanto amostras congeladas quanto FFEP, também revelaram a variação dos valores de sensibilidade com uso da qPCR em cães com sinais clínicos e sem sinais clínicos, respectivamente: 67% a 100% e 79% a 100%, confirmando a necessidade do uso da técnica de PCR principalmente para avaliar os grupos de cães sem sinais clínicos (CAMPOS et al., 2017; CARSON et al., 2010; DE CARVALHO et al., 2018; MOHAMMADIHA et al., 2013; QUEIROZ et al., 2011).

Amostras de sangue provenientes de cães com sinais clínicos apresentaram sensibilidade na cPCR variando entre 89% a 100%, porém esta sensibilidade foi reduzida quando o grupo assintomático foi analisado. Em estudos comparativos, a qPCR apresentou a maior sensibilidade (91%), seguido da cPCR (72%) e ITS-1 PCR (54%) (CARSON et al., 2010).

Xavier et al. (2006) comparando biópsia de pele de diferentes regiões verificaram 82,8% de sensibilidade da cPCR, superior as encontradas pelas técnicas de HE e IHQ.

A aplicação de novas variações da técnica de PCR foi enfocada por Albuquerque et al., (2017), que avaliaram a sensibilidade de quatro metodologias de PCR entre populações de cães com e sem sinais clínicos. Foram utilizadas as metodologias NESTED SSU rRNA-PCR, ITS1-PCR, MC-PCR e Uni 21/Lmj4-PCR. A metodologia NESTED SSU rRNA-PCR foi a que apresentou sensibilidade superior em cães com sinais clínicos (44%) enquanto que a metodologia ITS1-PCR apresentou a menor sensibilidade (12%). Já entre os cães sem sinais clínicos, a sensibilidade da NESTED SSU rRNA-PCR (25,3%) foi a de maior relevância.

Uma comparação entre diferentes metodologias de PCR, no qual foram avaliadas amostras do baço e da pele de cães positivos para LVZ por meio de cultura parasitológica e sorologia, verificou que a técnica de qPCR apresentou melhores resultados em relação às outras metodologias empregadas, com 100% de sensibilidade para as amostras obtidas do baço, enquanto que na pele a sensibilidade variou entre 90% e 100% (REIS et al., 2013).

A técnica de qPCR permite contínuo monitoramento da acumulação dos produtos da PCR (amplicons) durante a reação de amplificação dos ácidos nucleicos. As tecnologias SYBR Green e TaqMan são as mais frequentemente utilizadas. A tecnologia SYBR Green consiste de um sistema não específico de detecção, baseado em um intercalador dsDNA

fluorescente e é aplicável a todos os alvos potenciais. A tecnologia TaqMan é mais específica, uma vez que realiza a avaliação direta da quantidade de DNA amplificado usando uma sonda fluorescente específica para a sequência de destino ladeada pelo par de primer (MORTARINO et al., 2004).

Minicírculos de DNA presentes no cinetoplasto da *Leishmania* (kDNA) são o principal alvo molecular para a maioria dos testes de PCR destinados à detecção de *Leishmania* spp. por serem considerados os mais sensíveis. No entanto, outros alvos também são utilizados como Internal Transcribed Spacer (ITS-1), 18S rRNA e a glicoproteína 63 (gp-63) (TRAVI et al., 2018), que tem influência na sensibilidade. Estes alvos são os mais utilizados por serem genes de múltiplas cópias e que permitem aumentar a sensibilidade da PCR (PALTRINIERI et al., 2016; TRAVI et al., 2018).

Comparada à técnica de cPCR, a qPCR tem como vantagem o processamento das amostras em sistemas fechado, sendo menos propenso a contaminação por não necessitar de processamento pós amplificação, além de permitir o conhecimento preciso do número de cópias de DNA presentes na amostra, o que favorece no monitoramento de tratamentos leishmanicidas (MOHAMMADIHA et al., 2013; PALTRINIERI et al., 2016). As desvantagens das técnicas de PCR, tanto qualitativa quanto quantitativa, são a falta de padronização dos protocolos, a não detecção de infecção ativa pela cPCR e uma menor sensibilidade em amostras FFEP (CAMPOS et al., 2017).

2 JUSTIFICATIVA

A expansão da LV no Brasil, bem como a urbanização da doença com casos humanos e grande quantitativo de cães positivos em várias cidades de grande e médio porte têm sido descritas (COURA-VITAL et al., 2011; DA SILVA et al., 2011), inclusive em áreas anteriormente livres da infecção (DE PAULA et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2010).

Medidas de controle implementadas pelo MS, como a eutanásia de cães infectados, têm se mostrado ineficazes no controle da LV. Uma das causas dessa ineficácia pode ser a baixa acurácia dos testes sorológicos empregados, o que vem permitindo a manutenção de animais infectados em áreas endêmicas e a eutanásia desnecessária de cães devido a resultados falso-positivos, o que reforça a tese de que tais técnicas não devam ser utilizadas isoladamente (BRASIL, 2014).

A biópsia de pele íntegra é um bom alvo para identificação e diagnóstico do parasito. Isto se dá pelo fato da pele ser o sistema corporal onde mais comumente se encontram sinais da doença e onde ocorrem as primeiras interações entre o parasita e o sistema de defesa do hospedeiro infectado, reforçando a importância dos cães no ciclo infeccioso da doença (BRASIL, 2014; CAMPOS et al., 2017; GONTIJO E MELO, 2004; QUEIROZ et al., 2011; TAFURI et al., 2004;). Em trabalhos de campo, onde as condições de refrigeração e transporte de amostras biológicas são difíceis ou por vezes impossíveis, as mesmas são imediatamente fixadas em formalina tamponada a 10%. Este tipo de amostra permite a realização de técnicas HP ou PCR para diagnóstico confirmatório da infecção por *L. infantum* em cães, porém inviabiliza a cultura parasitológica para isolamento do parasito e identificação de sua espécie. Técnicas de PCR realizadas nesse tipo de amostra apresentam baixa sensibilidade e maior dificuldade para identificação da espécie de *Leishmania* spp. quando comparadas com a técnica de PCR realizada em amostras teciduais frescas congeladas (CAMPOS et al., 2017). O uso da técnica de ISH utilizando a sonda específica para o complexo *L. donovani* mostrou ter boa sensibilidade e especificidade, detectando de maneira inequívoca a espécie de *L. infantum* presente em tecidos FFEP (DINHOPL et al., 2011; MENEZES et al., 2013).

O estudo comparativo entre as técnicas de ISH e qPCR para diagnóstico da infecção por *L. infantum* em tecidos FFEP usando como referência a cultura parasitológica são escassos, o que motivou a realização deste trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a sensibilidade das técnicas de ISH e qPCR em amostras de pele íntegra FFEP para diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães usando a técnica de cultura parasitológica como método padrão de referência.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Comparar a sensibilidade das técnicas de ISH e qPCR em amostras de pele íntegra fixadas em formalina tamponada a 10% e emblocadas em parafina, para diagnóstico da infecção por *L. infantum* entre cães sem sinais clínicos e doentes.
- 2) Verificar a concordância interobservadores no diagnóstico da infecção cutânea por *L. infantum* em cães pela técnica de ISH.
- 3) Avaliar a carga parasitária de *L. infantum* obtida pela qPCR e relacionar ao resultado da ISH.
- 4) Avaliar a carga parasitária de *L. infantum* obtida pela qPCR entre cães com presença de sinais clínicos e ausência de sinais clínicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foi realizado um estudo retrospectivo com a utilização de uma amostra de conveniência composta de fragmentos de pele íntegra da região escapular de 48 cães com resultados positivos para *L. infantum* confirmados por meio das técnicas de cultura parasitológica a partir destes fragmentos e posterior identificação pelo método de eletroforese de enzimas *multilocus*.

A amostra selecionada contém espécimes de 27 cães com presença de sinais clínicos e 21 cães com ausência de sinais clínicos.

Os fragmentos de pele foram coletados de cães por meio de biópsia da região escapular com uso de um *punch* de 3 mm. Os cães foram provenientes de áreas endêmicas para LVZ entre os anos de 2008 e 2016. As cidades de origem destes animais foram: Barra Mansa, RJ; Bauru, SP; Brasília, DF; Fortaleza, CE; Maricá, RJ; Niterói, RJ; Rio de Janeiro, RJ; Palmas, TO. Após a coleta, os fragmentos foram imediatamente fixados em formalina tamponada a 10% e posteriormente processados para emblocamento em parafina. Um fragmento de pele também foi armazenado imediatamente em solução salina estéril para realização das técnicas de cultura parasitológica e caracterização isoenzimática.

Foram considerados cães com sinais clínicos sugestivos de LVZ aqueles que apresentavam pelo menos uma das seguintes alterações: magreza, caquexia, alopecia geral ou localizada, lesões cutâneas caracterizadas por úlceras e descamação, onicogribose, aumento de linfonodos superficiais, hepatomegalia, esplenomegalia, mucosa ocular ou oral hipocoradas, ceratoconjuntivite e atrofia muscular esquelética. O outro grupo foi caracterizado por cães com ausência de sinais clínicos sugestivos de LVZ.

Os procedimentos de cultura parasitológica e caracterização isoenzimática foram realizados, obedecendo as seguintes etapas: os fragmentos de pele coletados por biópsia foram mergulhados imediatamente em solução salina estéril e semeados em meio de cultura bifásico NNN (Novy, MacNeal e Nicolle) / Schneider Medium Insect (Sigma-Aldrich Co, St.Louis, MO, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino e incubados a 26-28°C. As formas

promastigotas de *Leishmania* spp. isoladas foram identificadas por eletroforese enzimática *multilocus*, utilizando seis sistemas enzimáticos (CUPOLILLO et al., 1994; MADEIRA et al., 2009). A cultura parasitológica foi realizada no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do INI/ Fiocruz.

4.2 TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

Para a técnica ISH, foram obtidos dois a três cortes de 5 µm de espessura dos blocos de parafina, que foram colocados em lâminas silanizadas (Erviagas, ERV – SF PLUS, São Paulo, Brasil). Foi utilizado o kit ZytoFastPlus CISH implementation AP-NBT/BCIP® (Zytovision GmbH Bremerhaven, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. O processo teve início com o acondicionamento das lâminas em estufa a 75°C por 20 minutos, seguido do processo de desparafinização em xilol, com primeira imersão por 10 minutos e mais dez imersões subsequentes por 1 minuto. A seguir, as lâminas foram submetidas a um processo de reidratação com uso de etanol nas concentrações de 100%, 96%, 70%, permanecendo 1 minuto em cada concentração. Logo após as lâminas foram lavadas em água corrente durante 3 minutos e, posteriormente, em água destilada durante 2 minutos. Após a etapa de hidratação, as lâminas foram submetidas a tratamento proteolítico com uso de pepsina, durante 2 minutos a 37°C, em câmara úmida. A técnica seguiu com a lavagem das lâminas em água destilada com dois banhos de 1 minuto cada. A etapa de condicionamento celular ou tratamento térmico ocorreu em equipamento de banho-maria, à temperatura de 99°C durante 30 minutos, com uso de solução tampão EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) (pH=6,0) presente no kit comercial. Após o condicionamento celular, as lâminas ficaram em temperatura ambiente por 20 minutos no mesmo tampão e foram lavadas em água destilada (dois banhos de 1 minuto), desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) durante 1 minuto em cada concentração e secas em estufa a 37° durante 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas no aparelho hibridizador Thermobrite® (StatSpin Inc, Westwood, MA, EUA), incubadas com sonda de oligonucleotídeos específica para *L. infantum* (5'- CCTACCCGGAGGACCAGAAAAGTT-3') ligada à digoxigenina na extremidade 5', segundo Menezes et al., (2013), na diluição de 1:500, utilizando a solução tampão de hibridização Hybridization Solution H7782 (Sigma-Aldrich Co, St.Louis, MO, EUA). Para incubação com a sonda, os cortes histológicos foram

cobertos com lamínula plástica Hybri-slips (Sigma-Aldrich Co, St.Louis, MO, EUA) e seladas com cola Fixogum® (Marabu, GmbH Bietigheim-Bissingen, Alemanha). No hibridizador, foi realizada a desnaturação a 75°C por 5 minutos e, logo a seguir, hibridização a 37°C *overnight*. Após o término do ciclo de hibridização, seguindo as recomendações do fabricante, as lamínulas foram retiradas, e a partir daí as lâminas foram submetidas a três banhos de estringência em tampão TRIS (TBS) 1X concentrado. O primeiro a 55°C e os demais à temperatura ambiente. Após esta etapa, as lâminas foram submetidas a incubação com anticorpo anti-digoxigenina produzido em coelhos, seguido por incubação com anticorpo anti-anticorpo de coelhos conjugado com polímero e fosfatase alcalina. A revelação do sinal é feita com adição de 5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato (BCIP) e 4-nitro blue cloreto de tetrazolium (NBT) e posterior contracoloração com corante nuclear vermelho rápido. Após estas etapas, as lâminas foram montadas com lamínulas para posterior leitura em microscópio óptico.

Em todos os ensaios de hibridização *in situ*, cortes histológicos de tecidos positivamente parasitados por formas amastigotas de *L. infantum* foram incubados em presença da sonda específica, atuando assim como controle positivo, e estritamente com a solução de hibridização e ausência da sonda específica, representando o controle negativo. A técnica de hibridização *in situ* foi executada no Serviço de Anatomia Patológica do INI/Fiocruz.

4.2.1 Leitura das lâminas de hibridização *in situ*

A interpretação microscópica foi realizada por dois observadores:

A) Observador 1: Médico veterinário patologista do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos do INI-Fiocruz, também com ampla experiência no diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e ISH em leishmanioses.

B) Observador 2: Atua na área de Controle de Qualidade em Imunobiológicos do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos-Fiocruz. Durante o curso de mestrado participou de treinamentos relacionados à área de diagnóstico histopatológico, principalmente voltados à técnica de ISH.

Todas as lâminas foram examinadas ao microscópico óptico (40X e 100X) para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp. e o resultado final das leituras foi obtido a partir do observador com maior experiência para o diagnóstico de *L. infantum* na técnica de ISH.

As amostras de tecido submetidas a reação de ISH para detecção de formas amastigotas foram consideradas positivas quando observadas ao menos duas estruturas marcadas em azul escuro e morfologicamente compatíveis com formas amastigotas de *Leishmania* spp. Também foram consideradas na confirmação do diagnóstico a forma, o tamanho e a localização das estruturas no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos.

4.3 REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE qPCR

4.3.1 Extração e Purificação de DNA a partir de amostras parafinadas

Na técnica de PCR quantitativa (qPCR), as amostras de pele íntegra FFEP foram submetidas a oito cortes histológicos de 5 µm de espessura. Para evitar a contaminação entre as amostras, o micrótomo foi higienizado com etanol a 70%, e teve a lâmina descartável substituída a cada nova amostra. Os cortes histológicos foram coletados com auxílio de pinças estéreis e transferidos diretamente para microtubos de 1,5 mL (DNase e RNase free), previamente identificados. A desparafinização das amostras foi realizada com a adição de 1 mL de xilol, seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos. Após estas etapas, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de etanol a 100%. As amostras sofreram nova centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 1h para completa evaporação do etanol e posterior processamento de extração de DNA de acordo com as recomendações do fabricante do kit comercial QIAamp® DNA FFPE Tissue (Qiagen, Califórnia, EUA). O sedimento obtido foi ressuspenso em 180 µL de tampão de lise (ATL) e em seguida foram adicionados 20 µL de solução de proteinase K seguidas por um processo de incubação em banho-seco a 56°C por 1h, seguida de incubação a 90°C por mais 1h. Após esta etapa, as amostras foram submetidas a extração automática no equipamento QIAcube®, exclusivo para

operar com os kits de extração desenvolvidos pela empresa QIAGEN. O DNA extraído foi identificado com data do processamento e o código da extração, sendo acondicionados à temperatura de -20°C .

4.3.2 Quantificação de DNA por fluorimetria

Após a etapa de extração, O DNA obtido de cada amostra foi quantificado a partir da utilização de corantes fluorescentes presentes no “kit” Qubit® dsDNA HS Assay e com o uso da plataforma Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente, foi necessário o preparo da solução de trabalho com 199 μL de tampão Qubit e 1 μL de reagente Qubit para cada amostra que foi analisada. A seguir, foram estabelecidas as curvas de concentração de DNA com os dois reagentes-padrão presentes no kit, dos quais um representava o menor ponto da curva (padrão 1) e o outro o maior ponto (padrão 2). O preparo dos padrões foi feito em microtubos distintos, com a adição de 190 μL da solução de trabalho e 10 μL do padrão 1 ou 2, sendo as preparações homogeneizadas e incubadas à temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida, os microtubos com as curvas de padrão foram inseridos no fluorímetro de leitura e a curva padrão foi registrada. No preparo das amostras para quantificação, foram adicionados 199 μL da solução de trabalho e 1 μL da amostra de DNA a ser quantificada e incubada a temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida as amostras foram submetidas à leitura no fluorímetro onde a concentração de DNA em nanogramas por microlitro ($\text{ng}/\mu\text{L}$) foi definida por meio da curva-padrão, sendo os valores registrados. O limite de detecção desta metodologia é de 0,0005 ng de DNA em 1 μl de diluente.

4.3.3 Protocolo de amplificação de DNA por PCR quantitativa

Em sequência às etapas de extração e quantificação do DNA, as amostras foram submetidas à amplificação por PCR quantitativa, utilizando-se a plataforma 7500 Fast Real-

Time PCR System™ (Applied Biosystems®, CA, EUA) e sondas de hidrólise TaqMan® MGB. As amostras foram analisadas em triplicata.

A sonda de hidrólise TaqMan® MGB (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os iniciadores foram desenhados para reconhecer as regiões conservadas do kDNA de *L. infantum*. Os iniciadores LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3') e a sonda (FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-NFQ-MGB) selecionados para este experimento foram descritos em estudos anteriores no protocolo de OLIVEIRA et al. (2017) e CAMPOS et al. (2017). O volume final da solução para que a reação de amplificação ocorresse foi de 25 µL por poço, onde 5 µL foi o volume de amostra utilizada e 20 µL correspondeu a solução de reagentes. A solução de reagentes continha 12,5 µL do reagente TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems®), 1,5 µL dos iniciadores LEISH-1 e LEISH-2 a 900nM e 2,5 µL da sonda a 200 nM. As reações foram realizadas em placa de 96 poços (Applied Biosystems), que receberam vedação com filme adesivo (Applied Biosystems) após a adição de todos os componentes da reação. O protocolo de amplificação adotado foi o seguinte: um ciclo de 50°C por 2 minutos, um ciclo de desnaturação a 95°C por 10 minutos e quarenta ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e de anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Em cada placa envolvida no processo de amplificação de DNA foram utilizados controle positivo (cultura de *L. infantum*) e negativo (água ultrapura).

O limiar basal de fluorescência para determinação do ciclo de quantificação (Cq) ou threshold foi fixado em 0,1. O ponto de corte para a definição dos resultados detectáveis foi fixado em 37 ciclos e amostras com Cq superior a 37 foram consideradas indetectáveis. O limite de detecção estabelecido a partir de repetições da curva-padrão com diluições seriadas foi de 0,0025 gEq de *L. infantum* /reação (CAMPOS et al., 2017).

4.3.4 Teste da qualidade do DNA

O ensaio realizado com o kit Taqman® Gene Expression Assay system (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) é aplicado na distinção de resultados falso-negativos nas amostras com ausência de amplificação do DNA pela técnica de qPCR. Falso-negativos geralmente são originados pela presença de inibidores na reação de amplificação de DNA ou

mesmo pela presença de DNA degradado em algumas amostras. O kit contém par de iniciadores e sonda predefinidos para a amplificação através da qPCR de um segmento do gene constitutivo canino que codifica para a subunidade proteica β -actina (Cf03023880_g1).

A β -actina pertence a uma classe de genes chamados de genes domésticos e suas proteínas normalmente executam funções constitutivas celulares.

Este é um teste qualitativo, com resultados definidos pela presença ou ausência da subunidade proteica β -actina. A quantificação positiva revela que a amostra contém DNA íntegro e livre de inibidores, e define a amostra em estudo como negativa para *L. infantum* na qPCR. Resultado negativo, ou seja, onde as amostras não apresentam produto amplificado, define a análise da amostra quanto a pesquisa de *L. infantum* como inconclusivos (CAMPOS et al., 2017).

Semelhante a etapa de amplificação, o volume final para reação foi de 25 μ L por poço, sendo 2 μ L de amostra alvo e 23 μ L de solução com a seguinte composição: 12,5 μ L do reagente TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems®), 1,25 μ L da solução de iniciadores e sonda e 9,25 μ L de água ultrapura.

As etapas de extração e purificação de DNA e quantificação de DNA foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em animais Domésticos do INI/Fiocruz; as técnicas de amplificação de DNA e pesquisa de DNA residual foram executadas no Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados utilizados para as análises foram organizados em um banco de dados no programa Excell Office para Windows e analisados por meio do software STATISTICA 13.0.

Os resultados do observador que detectou o maior número de amostras positivas para *L. infantum* na técnica de hibridização *in situ* foram utilizados para o cálculo de sensibilidade da técnica.

As sensibilidades e os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram calculados usando a cultura parasitológica como método padrão de referência.

A concordância interobservadores para técnica de ISH foi estimada pelo índice *Kappa*, de acordo com Landis e Koch (1977), assim como a concordância entre as técnicas de ISH e qPCR.

O teste Qui-Quadrado foi utilizado para verifica a independência entre as variáveis. O nível de significância estipulado foi de 5%. Foram elaboradas tabelas de contingências para a realização deste teste.

A comparação entre os grupos positivos e negativos da técnica ISH e dos grupos com presença e ausência de sinais clínicos foi realizada por meio de estatística descritiva da quantificação de gEq de *L.infantum* da qPCR presente nestes grupos.

O software utilizado na obtenção dos dados da qPCR foi o AccuSEQ™.

4.5 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo utiliza *espécimes* clínicos (pele) obtidos no projeto intitulado “Hibridização *in situ* no diagnóstico de infecção por *Leishmania infantum* em cães domésticos” aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Fiocruz), licença LW-54/13 e no projeto intitulado “Construção de um painel de soros caninos para o Ministério da Saúde utilizar na validação de kits de diagnósticos para Leishmaniose Visceral (LV)”, aprovado pela CEUA/Fiocruz, licença L-038/08.

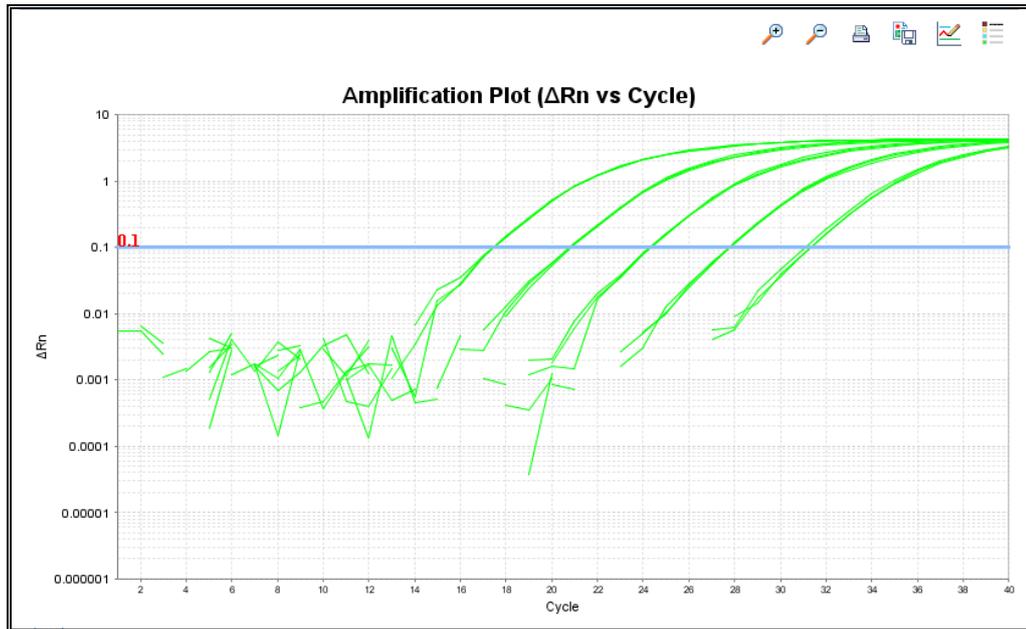
5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA qPCR PARA *L. infantum*

O estabelecimento de curvas-padrão para cada placa de reação foi necessário para determinar o número de cópias equivalentes do genoma (gEq) de *L. infantum* em amostras de DNA de pele íntegra de cães FFEP. Por meio da análise das curvas-padrão obtidas foi aferida uma eficiência média da qPCR de 96,845% (Min: 94,946 e Max: 98,744%), referente à média de slope de -3,3 (Min: -3,3 e Max: -3,4), e média Y-intercepto de $C_q = 34,433$ (Min: 34,147 e máx: 34,719), com média de ajuste dos valores à curva (R^2) de 0,99 (Figura 1).

Em nosso estudo, onze amostras apresentaram C_q superior a 37, definido como ponto de corte, e foram classificadas como indetectáveis.

(A)



(B)

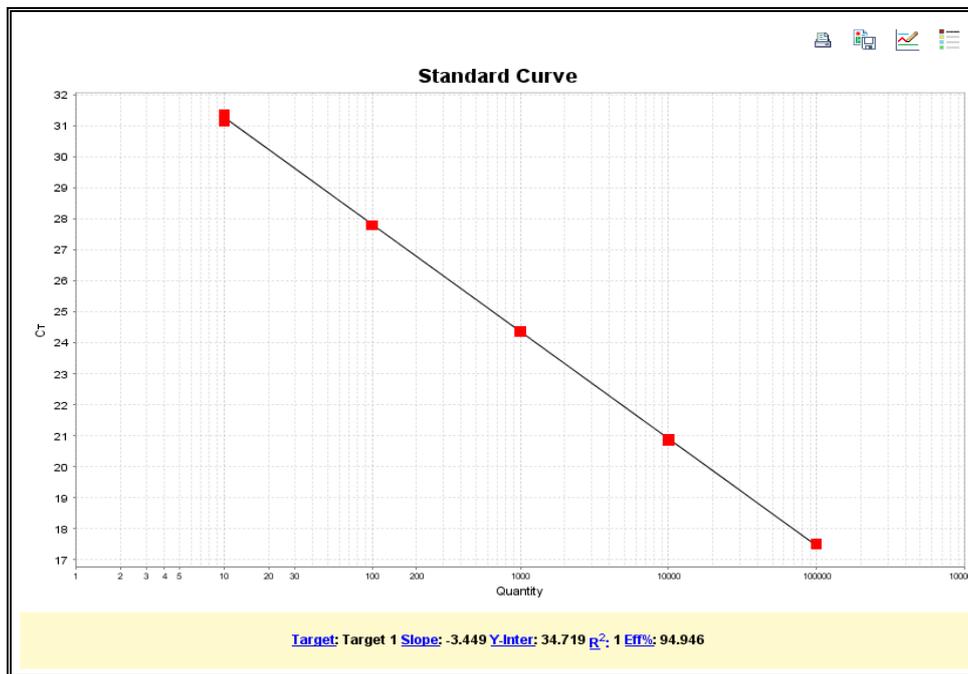


Figura 1. Gráfico representativo da curva-padrão (A) utilizada para quantificação de *L. infantum* a partir da amplificação de região do kDNA, com *threshold*, indicado pela linha azul, fixado em 0,1. Os valores dos ciclos de quantificação (C_q) estão apresentados em (B), em que os pontos da curva indicam a diluição seriada na base 10 de 500 a 0,05 gEq de *L. infantum* / μ L. Os índices *Slope*, *Y-inter*, R^2 e eficiência da qPCR estão apresentados.

5.2 VALORES DE SENSIBILIDADE DAS TÉCNICAS ISH E QPCR

A sensibilidade para o diagnóstico de *L. infantum* encontrado pela técnica de qPCR foi 77,1 % (IC 95% 75,4%-78,8%), enquanto que para técnica de ISH foi 58,3% (IC 95% 56,3%-60,3%) (Tabela 1).

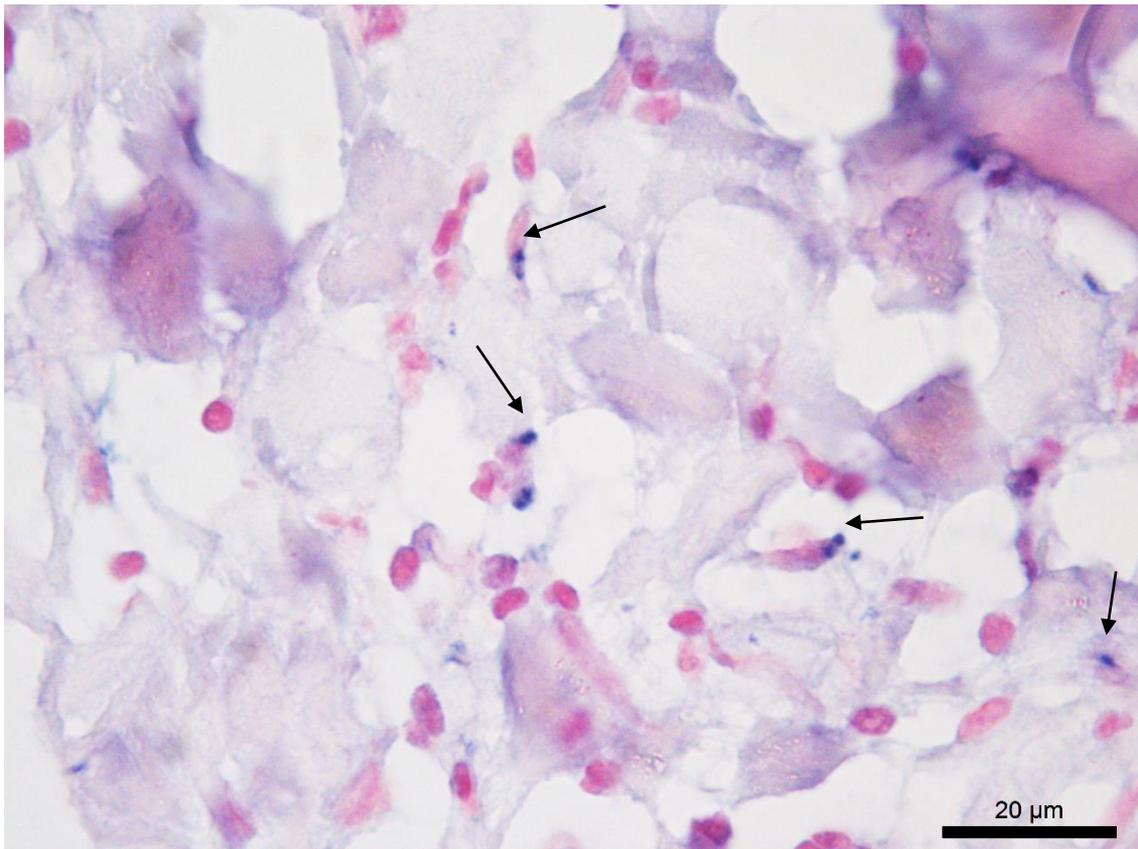


Figura 2. Hibridização *in situ* em amostra de pele de cão mostrando diversas formas amastigotas de *L. infantum* coradas em azul escuro (setas) e localizadas no citoplasma de macrófagos.

Na ISH, foram observadas alterações morfológicas na pele como perda de tecido e fragmentação do colágeno (Figura 3), que, por vezes, dificultaram a visualização das formas amastigotas de *Leishmania* spp.

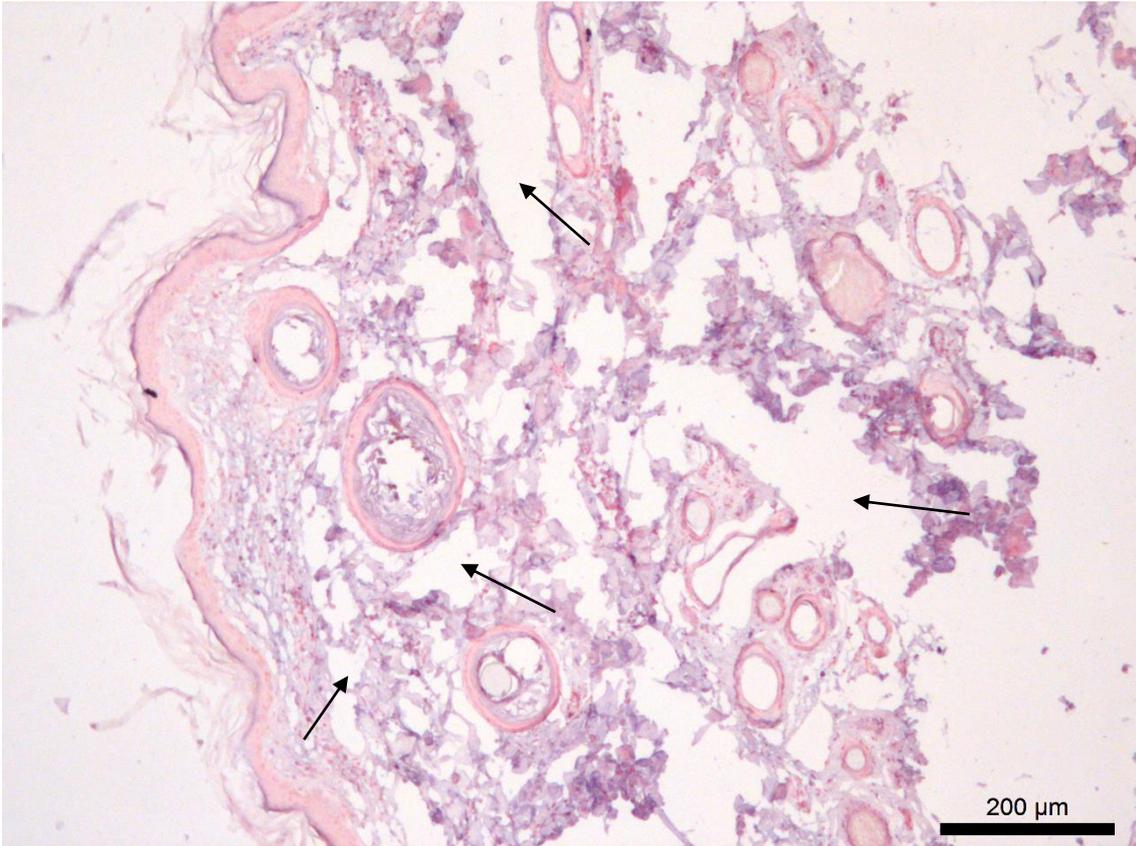


Figura 3. Hibridização *in situ* em amostra de pele de cão mostrando múltiplas áreas de fragmentação do colágeno da derme (setas).

O número de amostras positivas e negativas para cada técnica realizada está descrito na tabela 1.

Tabela 1. Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de *L. infantum* pelas técnicas de ISH e qPCR em amostras de pele FFEP de cães com infecção por *L. infantum* confirmada pela cultura parasitológica.

ISH	qPCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	25	3	28
Negativo	12	8	20
Total	37	11	48

ISH: Hibridização *in situ*; qPCR: PCR quantitativa

Do universo de 27 cães com presença de sinais clínicos, 15 (55,6%) apresentaram positividade pela técnica de ISH para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* na pele, enquanto que na população de 21 cães com ausência de sinais clínicos, 13 (62%) obtiveram resultado positivo (tabela 2).

Tabela 2 Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de *L. infantum* pela técnica de ISH de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos, em amostras de pele FFEP de cães com infecção por *L. infantum* confirmada pela cultura parasitológica.

ISH	Sinais Clínicos				Total	
	Presentes		Ausentes		N	%
	N	%	N	%		
Positivo	15	31%	13	27%	28	58%
Negativo	12	25%	8	17%	20	42%
Total	27	56%	21	44%	48	100%

ISH: Hibridização *in situ*; N= número de amostras

Não se observou associação entre os resultados da técnica ISH com estado clínico do animal, ao nível de 5% de significância (p-valor 0,658), ou seja, ser positivo ou não na técnica de ISH independe da presença ou ausência de sinal clínico de LV nos cães.

Na técnica de qPCR para o diagnóstico de infecção de *L. infantum* na pele, do universo de 27 cães com presença de sinais clínicos, 19 (70,4%) apresentaram positividade pela técnica, enquanto que na população de 21 cães com ausência de sinais clínicos, 18 (85,7%) obtiveram resultado positivo (tabela 3).

Tabela 3 Casos positivos e negativos para as formas amastigotas de *L. infantum* pela técnica de qPCR de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos, em amostras de pele FFEP de cães com infecção por *L. infantum* confirmada pela cultura parasitológica.

qPCR	Sinais Clínicos				Total	
	Presentes		Ausentes		N	%
	N	%	N	%		
Positivo	19	40%	18	38%	37	77%
Negativo	8	17%	3	6%	11	23%
Total	27	56%	21	44%	48	100%

qPCR: PCR quantitativa; N= número de amostras.

Não foi verificada associação entre sinais clínicos com os resultados qualitativos da qPCR, ao nível de 5% de significância (p-valor 0,20). Esse resultado evidencia que detecção do DNA do parasito na pele pela qPCR independe da presença ou ausência de sinal clínico de LV nos cães.

5.3 CONCORDÂNCIA INTEROBSERVADORES NA TÉCNICA DE ISH

O valor do coeficiente *Kappa* obtido nesta análise foi 0,32. Este valor sugere uma força de concordância suave, segundo sugestão de Landis e Koch (1977) para a interpretação da magnitude do coeficiente *Kappa* (tabela 4).

O percentual de concordância interobservadores foi de 66,67% (IC95% 51,59% - 79,60%).

Tabela 4. Resultados obtidos pelos dois observadores para a técnica de ISH em amostras de pele FFEP de cães com infecção por *L. infantum* confirmada pela cultura parasitológica.

ISH 1	ISH 2				Total	
	Positivo		Negativo		N	%
Positivo	19	39,58%	9	18,75%		
Negativo	7	14,58%	13	27,08%	20	41,67%
Total	26	54,17%	22	45,83%	48	100,00%

ISH 1: Observador principal da técnica de hibridização *in situ* ISH 2: Segundo observador da técnica de hibridização *in situ*.

5.4 CARGA PARASITÁRIA DE *L. infantum* OBTIDA PELA qPCR EM CÃES POSITIVOS E NEGATIVOS PARA ESSE PARASITO NA TÉCNICA DE ISH

As amostras positivas e negativas obtidas pela técnica de ISH foram comparadas com os respectivos equivalentes genômicos (gEq) de *L. infantum* obtidos pela qPCR, por meio de suas estatísticas descritivas (tabela 5).

A associação entre a técnica ISH com as cargas parasitárias de *L. infantum* expressas em equivalentes genômicos do parasito (gEq) obtidos pela qPCR, determina que as variáveis são dependentes entre si (p-valor 0,007), ou seja, a classificação da ISH apresenta algum grau de dependência da classificação da qPCR.

De acordo com o coeficiente de contingência obtido ($=0,118$), o grau desta classificação é baixo.

Tabela 5. Estatística descritiva das cargas parasitárias de *L. infantum* determinadas pela qPCR e expressas em equivalentes genômicos do parasito (gEq) em amostras de pele positivas e negativas para *L. infantum* pela técnica de ISH.

ISH	Carga parasitária de <i>L. infantum</i> em (gEq)				
	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Mediana
Positivo (N=25)	15.822,76	0,079225	371.632,7	74.163,97	56,78593
Negativo (N=12)	9,059252	0,002287	42,71348	13,33841	4,616317
Total (N=37)	10.693,99	0,002287	371.632,7	61.017,91	12,82

ISH: Hibridização *in situ*; N= número de amostras

5.5 CARGA PARASITÁRIA DE *L. infantum* OBTIDA PELA qPCR EM CÃES COM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE SINAIS CLÍNICOS

O grupo de cães com presença e ausência de sinais clínicos foram comparados por meio de suas estatísticas descritivas com os respectivos equivalentes genômicos (gEq) de *L. infantum* obtidos pela qPCR (tabela 6).

Tabela 6. Estatística descritiva das cargas parasitárias de *L. infantum* determinadas pela qPCR e expressas em equivalentes genômicos do parasito (gEq) de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos

Sinais clínicos	Carga parasitária de <i>L. infantum</i> em (gEq)				
	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Mediana
Presentes (N=19)	20.482,91	0,0023	371.632,70	85.075,73	11,38
Ausentes (N=18)	361,24	0,0063	2.708,30	783,48	25,98
Total (N=37)	10.693,99	0,0023	371.632,70	61.017,91	12,82

N= número de amostras.

5.6 CONCORDÂNCIA ENTRE AS TÉCNICAS

A determinação de concordância entre as técnicas ISH e qPCR foi feita utilizando o método de *Kappa* (LANDS; KOCH, 1977).

O valor do coeficiente *Kappa* obtido nesta análise foi de 0,31, que sugere uma força de concordância suave, segundo proposta de Landis e Koch (1977) para a interpretação da magnitude do coeficiente *Kappa*.

A porcentagem de concordância entre as técnicas foi de 68,75% (53,75%-81,34%), com intervalo de confiança de 95%.

6 DISCUSSÃO

A técnica de qPCR apresentou uma sensibilidade maior do que a ISH na detecção de *L. infantum* em amostras de pele íntegra FFEP de cães com e sem sinais clínicos provenientes de área endêmica. Apesar de serem técnicas moleculares, a maior sensibilidade da qPCR era esperada, pois é baseada na amplificação dos ácidos nucleicos do agente etiológico presente na amostra, enquanto a técnica de ISH visa a detecção de ácidos nucleicos do patógeno que já estão presentes na amostra, sem amplificação (SEGALES et al., 1999; MAES et al., 2014). A menor frequência de positividade pela técnica de ISH em comparação com a PCR também foi observada por Dinhopl et al., (2011). Esses autores analisaram diversos tecidos FFEP de treze cães com suspeita clínica ou soropositividade para infecção por *Leishmania* spp. e demonstraram que a ISH com uso de sonda genérica para *Leishmania* spp. foi negativa em três cães em um total de seis positivos para *Leishmania* spp pelo cPCR. A baixa concordância entre a qPCR e a ISH no presente estudo ocorreu em função das diferenças de sensibilidade obtidas por essas técnicas.

A sensibilidade da qPCR no presente estudo foi satisfatória e esteve dentro da faixa de 45% a 100% relatada por outros autores em amostras de pele de cães examinadas pela técnica de PCR tendo como alvo o kDNA do parasito, incluindo a cPCR e qPCR, no diagnóstico de *L. infantum* em cães com e sem sinais clínicos, em amostras biológicas congeladas (LACHAUD et al., 2002; MANNA et al., 2004; QUEIROZ et al., 2011; REGINA-SILVA et al., 2014). Considerando amostras de pele FFEP, a sensibilidade da qPCR no presente estudo foi superior a sensibilidade de 63,9% relatada por Campos et al. (2017), que usou a mesma metodologia do presente estudo, e inferior a sensibilidade de 82,8% descrita por XAVIER et al. (2006) que usaram cPCR tendo kDNA do parasito como alvo.

Em relação aos achados de Campos et al. (2017), essa variação nas sensibilidades obtidas ocorreu devido aos diferentes métodos laboratoriais definidos como referência incluídos nos estudos, pela influência da classificação clínica dos cães avaliados e pelo número de cortes histológicos coletados para técnica de qPCR. Os referidos autores adotaram como padrão de referência para cálculo da sensibilidade, cães positivos em pelo menos uma das técnicas: cultura parasitológica, IHC e HP, enquanto que no presente estudo o padrão de referência foram cães positivos na cultura parasitológica. Adicionalmente, Campos et al. (2017) não discriminaram a classificação clínica dos cães, que pode ser um fator fundamental na sensibilidade da qPCR (DE CARVALHO et al., 2018; XAVIER et al., 2006). O número de

cortes de 5µm obtidos dos blocos de parafina para realização da qPCR por Campos et al. (2017) foi de cinco, enquanto que em nosso estudo utilizamos oito cortes. Uma maior quantidade de amostra pode ter possibilitado uma maior quantidade de DNA de *L. infantum* extraído, proporcionando uma melhor sensibilidade dessa técnica se comparado aos resultados descritos por Campos et al. (2017).

Por sua vez, a maior sensibilidade da cPCR para diagnóstico de *L. infantum* em amostras de pele de cães FFEP encontrada por Xavier et al. (2006), em comparação com os nossos resultados, não era esperada. Isso porque a técnica de qPCR é considerada uma técnica mais sensível do que a da cPCR (CARSON et al., 2010; MORTARINO et al., 2004). A sensibilidade mais elevada encontrada por Xavier et al. (2006) pode ter sido devido a diferente técnica utilizada, ao uso de uma amostra de conveniência composta por 29 cães (dez com sinais clínicos e dezenove sem sinais clínicos), inferior ao do presente estudo, a utilização como padrão de referência de cães positivos para *L. infantum* em amostras de fígado, baço ou linfonodo por HP ou citopatologia.

As diferenças entre o padrão de referência adotado por Xavier et al. (2006) em relação ao que foi utilizado no presente estudo pode ter selecionado cães com cargas parasitárias mais altas na pele, levando a obtenção de uma sensibilidade maior. Além disso os referidos autores também não mencionaram o número de cortes histológicos utilizados na técnica de cPCR, o que pode ter influenciado na sensibilidade da técnica. Além de ser considerada mais sensível em comparação com a técnica de cPCR no diagnóstico de *L. infantum* em cães, a qPCR apresenta outras vantagens tais como maior rapidez, menor possibilidade de contaminação e informações sobre a carga parasitária do animal, que é importante para o monitoramento da resposta ao tratamento (MORTARINO et al., 2004; PALTRINIERI et al., 2016).

No presente estudo, a técnica de ISH apresentou sensibilidade dentro da faixa de 44% a 75%, esperada para uma técnica histológica (incluído IHC, HP e ISH) usada na detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em amostras de pele de cães naturalmente infectados (MENEZES et al., 2013; QUEIROZ et al., 2011; XAVIER et al., 2006). Comparando as sensibilidades da técnica de HP em amostras de pele de cães para diagnóstico de *Leishmania* spp., que variam de 35,6 a 57,6% (XAVIER et al., 2006; QUEIROZ et al., 2011; MENEZES et al., 2013), a ISH demonstrou maior sensibilidade no presente estudo, corroborando com os achados de Menezes et al. (2013).

Em relação à técnica de IHC em amostras de pele de cães com LV, no presente estudo a ISH mostrou uma sensibilidade maior do que a de 44% relatada por Queiroz et al. (2011) e Xavier et al. (2006), porém inferior a sensibilidade de 69,5% relatada por Menezes et al.

(2013). Com relação a técnica de ISH, Menezes et al. (2013) também relataram sensibilidades superiores comparadas às do presente estudo. Para técnica de ISH usando sonda genérica para *Leishmania* spp., a sensibilidade encontrada foi 70,6% e para ISH usando a mesma sonda do presente estudo, a sensibilidade encontrada foi 74,5%. Diferente do nosso estudo, Menezes et al. (2013) usaram um protocolo automatizado, o que aumenta a consistência, confiabilidade, adequabilidade e a produtividade da técnica de ISH. Aliada a essas propriedades, o método automatizado permite uma melhor preservação do tecido, melhoria da intensidade do sinal de detecção das formas amastigotas pela sonda e um menor grau de marcação tecidual inespecífica (*background*) o que pode justificar a maior sensibilidade em comparação com o sistema semi-automatizado utilizado no presente estudo. De fato, foram observados danos na morfologia da pele no protocolo da ISH utilizada, ocasionados provavelmente pelas etapas de tratamento proteolítico e condicionamento celular, semelhante ao relatado por Boechat et al. (2016) em amostras de epidídimo, que podem ter prejudicado a sensibilidade da técnica. Particularidades da matriz extracelular composta basicamente por colágeno, elastina, laminina distribuídos por toda sua extensão, torna a pele fina e frágil, comprometendo por vezes um resultado adequado da técnica (NITTA; KISHIMOTO; GROGAN, 2003).

Apesar da ISH no presente estudo ter apresentado sensibilidades dentro de faixa de valores encontradas para HP e IHC (MENEZES et al., 2013; QUEIROZ et al., 2011; XAVIER et al., 2006) , apresenta superioridade por detectar ácidos nucleicos específicos do patógenos, permitindo assim a discriminação efetiva de *L. infantum* nas amostras, o que não é possível em outras técnicas histológicas. A técnica de ISH usando sonda específica para *L. infantum*, que foi neste estudo empregada, não apresentou reação cruzada com outras espécies de *Leishmania* spp. do Novo Mundo, bem como com outros patógenos (MENEZES et al., 2013). Diferentemente, em relação a técnica de IHC, já foram descritas reações cruzadas com patógenos histomorfologicamente similares como o *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix* spp. (FERREIRA 2017; QUINTELLA et al., 2009) e, na experiência do nosso laboratório, com *Trypanosoma cruzi*. Adicionalmente, A falta de anticorpos purificados anti-*Leishmania* spp. disponíveis comercialmente para execução da ISH e a necessidade de substituição por soro policlonal de coelho anti-*Leishmania* produzido *in house* ou soro hiperimune de cão anti-*Leishmania* obtido de cães naturalmente infectados prejudicam a padronização da técnica entre laboratórios, além de aumentarem o risco de reação cruzada com outros patógenos (MENEZES et al., 2013).

A sensibilidade da ISH esteve relacionada a carga parasitária na qPCR, tendo os casos positivos maior carga parasitária do que os casos negativos por essa técnica. Essa técnica não

foi capaz de detectar formas amastigotas de *L. infantum* na pele em amostras com carga parasitária inferior a 0,079 (gEq) de DNA desse parasito, detectadas em 37 ciclos de quantificação pela qPCR. A não detecção de formas amastigotas de *L. infantum* pela técnica de ISH em nove casos com carga parasitária superior a 0,079 (gEq) pode ter sido causada pela destruição tecidual promovida pelas etapas de tratamento enzimático e tratamento térmico. Esse dano tecidual pode ter impedido a visualização de formas amastigotas presentes no corte histológico, corroborando com os achados de Boechat et al. (2016) para o diagnóstico de *L. infantum* em amostras de epidídimo processadas pela técnica de ISH.

A baixa concordância entre as leituras das lâminas processadas pela técnica de ISH pelos dois observadores do presente estudo apontam uma limitação da técnica, cujos resultados de sensibilidade dependem da experiência do observador. Esses resultados diferem dos achados de Ferreira (2017), que relatou uma concordância substancial ou quase perfeita entre três leitores apresentando diferentes graus de experiência para técnica de ISH usando sonda genérica para *Leishmania* spp. no diagnóstico de LTA em amostras de pele de humanos. Além disso, os resultados de concordância da ISH obtidos por Ferreira (2017) foram superiores ao da imuno-histoquímica. A causa para os diferentes resultados de concordância interobservadores para técnica de ISH encontrados no presente estudo e no de Ferreira (2017) pode ter sido o grau de variação entre as experiências dos observadores nos dois estudos. Adicionalmente, no estudo de Ferreira (2017) pode ter havido um melhor desempenho da sonda genérica para *Leishmania* spp. em comparação com a sonda específica para *L. infantum* usada no presente estudo, caracterizado por uma marcação das formas amastigotas com sinal mais intenso e mais facilmente visível para o observador na microscopia óptica. Portanto, o treinamento dos observadores seria uma medida fortemente recomendada para minimizar as discrepâncias entre os resultados das leituras das lâminas processadas pela técnica de ISH no protocolo utilizado.

Embora a população estudada fosse representada somente por indivíduos com cultura parasitológica positiva para *L. infantum*, as técnicas utilizadas não foram capazes de detectar uma parcela dos casos. A ISH não detectou 42% dos casos, a qPCR não detectou 23% dos casos, enquanto que 17% dos casos não foram detectados por ambas as técnicas. Esses resultados demonstram, que estas técnicas, mesmo que combinadas, demonstram falhas de sensibilidade. Essa deficiência na detecção de casos positivos, tanto da ISH como da qPCR, pode estar relacionada ao processo de fixação em formalina a 10% e emblocamento em parafina. Reforçando essa hipótese, Campos et al. (2017) encontraram para técnica de qPCR uma sensibilidade de 63,6% em amostras de pele FFEP e de 100% em amostras de pele

congeladas para detecção de DNA de *L. infantum* em cães. Esses autores também verificaram que a concentração de DNA extraído é significativamente menor na qPCR em amostras de pele FFEP do que em amostras de pele congeladas, o que interferiu na sensibilidade desta técnica. De acordo com Maes et al. (2014), a fixação em formalina a 10% leva a formação de ligações cruzadas de proteínas ao DNA, causando a sua modificação química. Neste processo também ocorre a formação de ligações cruzadas entre proteínas que levam ao aprisionamento e a fragmentação de DNA. O emblocamento em parafina também pode causar danos aos ácidos nucleicos. Essas alterações acima descritas nos ácidos nucleicos em tecidos FFEP são responsáveis pela menor quantidade de DNA extraído em comparação com as amostras congeladas. Além disso, fragmentos menores de DNA, que tipicamente alcançam um tamanho de 300 a 400 pares de bases são obtidos de tecidos FFEP (MAES et al., 2014). Entretanto, esses danos provocados pela fixação em formalina tamponada a 10% e emblocamento em parafina podem ser minimizados, melhorando a sensibilidade da ISH e qPCR. A fixação da amostra em formalina tamponada por no máximo 36h e a utilização de parafina sintética de boa qualidade a uma temperatura de 60°C são medidas importantes para diminuir o dano aos ácidos nucleicos em amostras FFEP (MAES et al., 2014). Apesar da interferência negativa na sensibilidade das técnicas de ISH e qPCR, as amostras FFEP apresentam vantagens importantes em comparação a amostras frescas ou congeladas. Dentre essas vantagens está a possibilidade do armazenamento sem refrigeração, o que facilita o seu transporte e conservação em locais de pouca estrutura (LASKAY et al., 1995). Essas características favorecem o trabalho de campo em regiões distantes, onde é escassa a infraestrutura laboratorial. Adicionalmente, pela facilidade de coleta, armazenamento e possibilidade de estudos retrospectivos, a amostra tecidual FFEP é frequentemente a única enviada para diagnóstico de *L. infantum* em cães em nossa experiência de centro de referência para o diagnóstico de leishmanioses em animais.

Apesar da ISH e qPCR terem apresentado uma maior sensibilidade no diagnóstico de *L. infantum* em cães sem sinais clínicos em comparação com cães doentes, no presente estudo não houve diferença estatisticamente significativa entre esses resultados. Os maiores valores de sensibilidade encontrados para ambas as técnicas em cães sem sinais clínicos podem ser explicados pelo fato desses cães terem apresentado uma mediana de carga parasitária de *L. infantum* maior do que os cães com sinais clínicos. Xavier et al. (2006) também não constataram diferença significativa entre sensibilidade das técnicas avaliadas e sinais clínicos, embora tenham também encontrado uma maior sensibilidade da PCR em amostras de pele de cães FFEP sem sinais clínicos, diferentemente das técnicas histológicas. Queiroz et al. (2011)

não observaram diferença de sensibilidades da técnica de PCR em amostras de pele entre cães com e sem sinais clínicos, porém encontrou maior sensibilidade em cães com sinais clínicos pelas técnicas histológicas, apesar desses resultados não serem estatisticamente significantes. A homogeneidade dos resultados da frequência de positividade pela técnica de qPCR entre cães com sinais clínicos também foi observada por De Carvalho et al. (2018). Entretanto, Furtado et al. (2015) constataram, em amostras de pele FFEP, que em cães sem sinais clínicos a frequência de detecção de formas amastigotas pela técnica de ISH usando a mesma sonda específica do presente estudo foi significativamente maior em cães com sinais clínicos (81%) comparados aos sem sinais clínicos (47%). Considerados em conjunto, os resultados do presente estudo e os dos autores acima citados demonstram que a técnica de PCR e ISH são capazes de identificar *L. infantum* em amostras de pele em cães com ausência de sinais clínicos. Esses resultados demonstram a importância da realização dessas técnicas de diagnóstico como medidas de controle da doença, uma vez que os cães sem sinais clínicos podem ser fonte de infecção para o vetor e são mais dificilmente diagnosticados pelos métodos sorológicos usuais (DE CARVALHO et al., 2018).

As sensibilidades satisfatórias obtidas pela técnica de qPCR e ISH no presente estudo em amostras de pele FFEP demonstraram que são técnicas úteis para o diagnóstico da espécie *L. infantum* em situações onde a realização da cultura parasitológica é inviável e a única amostra biológica disponível são tecidos FFEP. A realização da cultura parasitológica está restrita a poucos centros de referência no Brasil e é comum a perda de amostras por contaminação microbiológica, sobretudo naquelas coletadas a campo e em regiões distantes do local de realização do exame (MENEZES et al., 2013). Nesse contexto, entre as duas técnicas avaliadas no presente estudo, a qPCR se mostrou a mais indicada como alternativa a cultura parasitológica, pela sua maior sensibilidade. A ISH é uma alternativa em casos onde a qPCR não está disponível ou quando apresenta resultados inconclusivos pela presença de inibidores da reação na amostra, tais como hemoglobina (MAES et al., 2014). Entretanto, o mais recomendado é a combinação das duas técnicas devido a propriedade da ISH em identificar infecção ativa e permitir a visualização das formas amastigotas de *L. infantum* nos tecidos e a sua correlação com as lesões teciduais encontradas, fato que não é possível pelo qPCR (MAES et al., 2014; MENEZES et al., 2013; PALTRINIERI et al., 2016).

7 CONCLUSÕES

- As técnicas de ISH e qPCR apresentaram sensibilidades satisfatórias no diagnóstico da infecção por *L. infantum* em amostras de pele de cães, inclusive naqueles com ausência de sinais clínicos, sendo a qPCR a técnica mais sensível;
- A utilização em conjunto das técnicas de ISH e qPCR aumenta a sensibilidade do diagnóstico de *L. infantum* na pele FFPE de cães e permite a identificação de infecções ativas por esse parasito;
- A concordância interobservadores pela técnica de ISH no diagnóstico da infecção por *L. infantum* em pele FFPE de cães foi baixa, demonstrando que a sensibilidade dessa técnica varia de acordo com a experiência do observador;
- ISH apresentou sensibilidade associada à carga parasitária na pele e não foi capaz de detectar formas amastigotas de *L. infantum* em amostras com carga parasitária baixa detectadas pela qPCR;
- A carga parasitária e as sensibilidades da ISH e qPCR foram maiores nos cães com ausência de sinais clínicos.

8 REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A.; CAMPINO, L.; CARDOSO, L. et al. Evaluation of four molecular methods to detect *Leishmania* infection in dogs. **Parasites & Vectors**, Londres, v.10:57, 2017.
- ALMEIDA, M.A.; JESUS, E.E.; SOUSA-ATTA, M.L. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.127, n.3, p.227-232, 2005.
- ALVES, C.F.; FIGUEIREDO, M.M.; SOUZA, C.C. et al. American tegumentary leishmaniasis: effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of *Leishmania* in skin. **PLoS One**, São Francisco, v.8, p.633-43, 2013.
- AMATO, V.S.; DUARTE, M.I.; NICODEMO, A.C.; et al., An evaluation of clinical, serologic, anatomopathologic and immunogistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.40, n.1, p.23-30, 1998.
- ARRUDA, M.M.; FIGUEIREDO, F.B.; CARDOSO, F.A. et al. Validity and Reliability of Enzyme immunoassays Using *Leishmania major* or *L. infantum* Antigens for the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLoS One**, São Francisco, v.8:7, 2013.
- ARRUDA, M.M.; FIGUEIREDO, F.B.; MARCELINO, A.P. et al. Sensitivity and specificity of parallel or serial serological testing for detection of canine *Leishmania* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.111, n.3, p.168-173, 2016.
- BOECHAT, V.C.; MENDES JÚNIOR, A.A.V.; MADEIRA, M.F. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs, **Parasitology Research**, Berlin, v.115, n.6, p.2371–2379, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016**. [online] disponível na internet via [http:// www.portalsaude.saude.gov.br](http://www.portalsaude.saude.gov.br). Arquivo consultado on line em 18 de fevereiro de 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. DF, 2014.

BRASILEIRO FILHO, G. (Org). **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

CAMPOS, M.P.; MADEIRA, M.F.; SILVA, D.A. et al. Accuracy of quantitative polymerase chain reaction in samples of frozen and paraffin-embedded healthy skin for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.69, n.6, p.1443-1450, 2017.

CARSON, C.; QUINNELL, R.P.; HOLDEN, J. et al. Comparison of Leishmania OligoC-TesT PCR with Conventional and Real-Time PCR for Diagnosis of Canine *Leishmania* Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.48, p.3325-3330, 2010.

CAVALCANTE R, PEREIRA M, GONTIJO NF. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagus insects. **Parasitology**, Cambridge, v.127, p.87-93, 2003.

CONCEIÇÃO-SILVA, F. (Org.); ALVES, C.R. (Org.). **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2014.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M.J.; VELOSO, V.M. et al. Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods, **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v.5, n.8, p. e1291, 2011.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H. A general classification of new world *Leishmania* using numeral zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Cleveland, v.50, p.296-311, 1994.

DE ALMEIDA, A.B.P.F.; SOUZA, V.R.F.; BOA SORTE, E.C. et al. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. **Vector-Born and zoonotic Diseases**, New York, v.11, n.12, p.1555-1560, 2011.

DE CARVALHO, F.L.N.; RIBOLDI, E.O.; BELLO, G.L. et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. **Epidemiology and Infection**. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0950268818000225>

DE PAULA, C.C.; FIGUEIREDO, F.B.; MENEZES, R.C. et al. Leishmaniose visceral canina em Maricá, Estado do Rio de Janeiro: relato do primeiro caso autóctone. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.42, p.77-8, 2009.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Geographical Distribution and Transmission. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, São Paulo, v.4, p.198-212, 1962.

DINHOPL, N.; MOSTEGL, M.M.; RICHTER, B. et al. *In situ* hybridization for the detection of *Leishmania* species in paraffin wax-embedded canine tissues using a digoxigenin-labelled oligonucleotide probe. **The Veterinary Record**, Londres, v.169, n.20, 2011.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, Londres, v.5:276, 2012.

FERREIRA, S.A.; LEITE, R.S.; ITUASSU, L.T. et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 6, n.4, p.1596, 2012.

FERREIRA, L.C. Avaliação da técnica de hibridização *in situ* para diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana em amostras de pele, 2017. Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2017.

FERRO, A.B. **Imunohistoquímica**. Lisboa, Portugal: 2016. Disponível em: <http://amadeuferro.webs.com/>. Acesso em: 10 de agosto de 2017.

FIGUEIREDO, F.B.; FILHO, C.J.L.B.; SCHUBACH, E.Y.P. et al. Relato de caso autóctone de leishmaniose visceral canina na zona sul do município do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.43, p. 98-9, 2010.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ, E. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis, **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.137, n.3, p.214–221, 2006.

FRICKMANN, H.; ALNAMAR, Y.; ESSIG, A. et al. Rapid identification of *Leishmania* spp. in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples by fluorescence *in situ* hybridization: Rapid identification of *Leishmania* spp. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v.17, n.9, p.1117–1126, 2012.

FURTADO, M.C.; MENEZES, R.C.; KIUPEL, M. et al. Comparative study of *in situ* hybridization, immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v.8,2015. Disponível em: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13071-015-1224-4>.

GALL, J.G.; PARDUE, M.L. Formation and Detection of RNA-DNA Hybrid Molecules in Cytological Preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.63, p.378-383, 1969.

GILBERT, M.T.P.; HASELKORN, T.; BUNCE, M. et al. The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues– Which Methods Are Useful When? **PLoS One**, São Francisco, v.2, n.6, 2007.

GOMES, Y.M.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; LIRA, R.A. et al. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, Londres, v.175, p.45-52, 2008.

GRADONI, L. The Leishmaniasis of the Mediterranean Region. **Current Tropical Medicine Reports**, Cham, v.4, p.21-26, 2017.

GRIMALDI JÚNIOR, G.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on *Dual-path platform* technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v.106, n.1, p.54–59, 2012.

IMAM, T. S. The complexities in the classification of protozoa: a challenge to parasitologists, **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, Kano, v.2, n.2, p.159–164, 2009.

KENNER, J. R.; ARONSON, N. E.; BRATTHAUER, G.L. et al. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. **Journal of Cutaneous Pathology**, Copenhagen, v.26, n. 3, p.130–136, 1999.

LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P. et al. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carries. **Parasitology**, Londres, v.125, p.197-207, 2002.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**. Washington, v. 33, n. 1, p. 159–174, 1977.

LASKAY, T.; MIKÓ, T.L.; NEGESSE, Y et al. Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v.89, p.273-275, 1995.

MADEIRA, M.F.; FIGUEIREDO, F.B.; PINTO, A.G.S. et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? **Research in Veterinary Science**, Londres, v.87, p.260-2, 2009.

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**, Londres, v.136, p.411–423, 2009.

MAES, R.K.; LANGOHR, I.M.; WISE, A.G. et al. H&E: integration of nucleic-acid based analyses into diagnostic pathology. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v.51, p.238-256, 2014.

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

MARCONDES, M.; LIMA, V.M.F.; ARAÚJO, M.F.L. et al. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.197, p. 649-652, 2013.

MARZOCHI M.C.; COUTINHO, S.G.; DE SOUZA, W.J. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.80, n.3, p.349-57, 1985.

MATOS, L.L.; TRUFELLI, D.C.; DE MATOS, M.G.L. et al. Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice, **Biomarker Insights**, Thousand Oaks, v.5, p.9–20, 2010.

MELLO, C. X.; SCHUBACH, A. O.; OLIVEIRA, R. V. C. *et al.*, Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, v.109, p.927–933, 2011.

MENEZES, R.C.; FIGUEIREDO, F.B.; WISE, A.G. et al. Sensitivity and Specificity of *In Situ* Hybridization for Diagnosis of Cutaneous Infection by *Leishmania infantum* in Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.51, n.1, p.206–211, 2013.

MOHAMMADIHA, A.; HAGHIGHI, A.; MOHEBALI, M. et al. Canine visceral leishmaniasis: A comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct

agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.192, p.83–90, 2013.

MORTARINO, M.; FRANCESHI, A.; MANCIANTI, F. et al. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. **Parassitologia**, Roma, v.46, n.1-2, p.163-167, 2004.

MÜLLER, N.; HENTRICH, B.; FREY, C.F. et al. Quantitative PCR for diagnosis of cutaneous leishmaniasis from formalin-fixed and paraffin-embedded skin sections. **Molecular and Cellular Probes**, Londres, v.29, p. 507-510, 2015.

MÜLLER, N.; ZIMMERMANN, V.; FOSTER, U. et al. PCR based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.114, p.223-229, 2003.

NITTA, H.; KISHIMOTO, J.; GROGAN, T.M. Application of Automated mRNA *In Situ* Hybridization for Formalin-fixed, Paraffin-embedded Mouse Skin Sections. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, Hagerstown, v.11, n.2, p.183-187, 2003.

NOGUEIRA, J.L.; SILVA, M.V.M.; PASSOS, C.C. et al. A importância da leishmaniose visceral canina para a saúde pública: uma zoonose reemergente. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v.7, p.1-12, 2009.

OLIVEIRA, V.D.C.; BOECHAT, V.C.; MENDES JUNIOR, 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**, São Francisco, v.12, n.4, 2017.

ORYAN, A.; AKBARI, M., Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Haikou, v.9, n.10, p. 925–932, 2016.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, Amsterdam, v.69, p. 10-18, 2014.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGU, L.; FONDATI, A. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Nova York, v. 236, p. 1184-1191, 2010.

PALTRINIERI, S.; GRADONI, L.; ROURA, X. et al. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, Baton Rouge, v.45, n.4, p.552–578, 2016.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L.A.; SANTOS, W.C. et al. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Cleveland, v.55, n.1, p.39-44, 1996.

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

QUINTELLA, L.P.; CUZZI, T.M.; OKAMOTO, T. et al. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture confirmed American Tegumentary Leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.51, p.83-86, 2009

RAMOS-VARA, J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v.42, n.4, p.405-426, 2005.

REGINA-SILVA, S.; FORTES-DIAS, C.L.; MICHALSKY, E.M. Evaluation of parasitological examination kDNA polymerase chain reaction and rK39-based immunochromatography for the diagnosis of visceral leishmaniasis in seropositive dogs from the screening-culling program in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.47, p.462-468, 2014.

REIS, L.E.S.; COURA-VITAL, W.; ROATT, B.M. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.197, p.498-503, 2013.

RIBEIRO, J. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annual Review of Entomology**, Califórnia, v.32, p. 463– 478, 1987.

ROSS, R. Further notes of Leishman's bodies. **British Medical Journal**, Londres, v.2, 1903.

SCHUBACH, E.Y.P.; FIGUEIREDO, F.B.; ROMERO, G.A.S. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v.108, n.9, p.568–574, 2014.

SEGALÉS, J.; RAMOS-VARA, J.A.; DURAN, C.O. et al. Diagnosing infectious diseases using in situ hybridization. **Swine Health Prod**, Perry, v.7, p.125-8, 1999.

SILVA, A.S.; FRANÇA, R.T.; RICHINI-PEREIRA, V.B. et al. First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in the center of Rio Grande do Sul State, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.39, p.1-4, 2011.

SILVA, D.A.; MADEIRA, M.F.; ABRANTES, T.R. et al. Assessment o serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **The Veterinary Journal**, Londres, v.195, p.252-253, 2013.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.165, n.1, p.1–18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. et al. Leishvet Guidelines for the Pratical Management of Canine Leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, Londres, v.4, p.86, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; VILLANUEVA-SAZ, S.; CARBONELL, M. et al. Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three comercial ELISA tests (Leiscan[®], ID Screen[®] and *Leishmania* 96[®]), a rapid test (Speed Leish K[®]) and na in-house IFAT. **Parasites & Vectors**, v.7, 2014. <https://www.parasitesandvectors.com/content/7-111>.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis, **Parasites & Vectors**, Londres, v.10, n.1, p.82, 2017.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.D.E.L.; ARANTES, R.M. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.292, n.1-2, p.17-23, 2004.

TOPLU, N.; AYDOGON, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. **Parasitology Research**, Berlin, v.109, p.1051-1057, 2011.

TRAVI, B.L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v.12:1, 2018.

VENTURIN, G.L.; BRAGATO, J.P.; SILVA, K.L.O. et al. Recombinant K28 antigen in ELISA in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Londres, v.37, p.670-673, 2015.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected tropical diseases, 2018. [online] Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en. Acesso em 11 de março de 2018.

WHO -WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis, 2018. [online] Disponível na internet via WWW URL: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en. Arquivo consultado em 04 de março de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Comitee**. Technical Report Series 949, Geneva, 202 p, 22-6 March 2010.

XAVIER, S.C.; ANDRADE, H.M.; MONTE, S.J.H. 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 Veterinary Research**, v.2, n.1, 2006. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/2/17>