

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

GABRIELLY BEVILAQUA MENDONÇA

**PREVALÊNCIA DE *Leishmania* spp. EM CÃES ASSINTOMÁTICOS ATENDIDOS
PELO PROGRAMA DE CASTRAÇÃO VOLUNTÁRIA NO HOSPITAL
VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**UBERLÂNDIA
2018**

GABRIELLY BEVILAQUA MENDONÇA

**PREVALÊNCIA DE *Leishmania* spp. EM CÃES ASSINTOMÁTICOS ATENDIDOS
PELO PROGRAMA DE CASTRAÇÃO VOLUNTÁRIA NO HOSPITAL
VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Medicina
Veterinária da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial para
obtenção do grau de Médica Veterinária.

Orientador (a): Prof. Dra. Michelle Aparecida
Ribeiro de Freitas

Coorientadora: Dra. Juliana Silva Miranda

UBERLÂNDIA

2018

GABRIELLY BEVILAQUA MENDONÇA

**POSITIVIDADE DE *Leishmania* spp. EM CÃES ASSINTOMÁTICOS ATENDIDOS
PELO PROGRAMA DE CASTRAÇÃO VOLUNTÁRIA NO HOSPITAL
VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Medicina
Veterinária da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial para
obtenção do grau de Médica Veterinária.
Orientador (a): Prof. Dra. Michelle Aparecida
Ribeiro de Freitas

Coorientadora: Dra. Juliana Silva Miranda

Uberlândia, ____ de _____ de 2018.

Banca Examinadora

Professora Doutora Michelle Aparecida Ribeiro Freitas
Orientadora (ICBIM-UFU)

Professora Doutora Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi
Examinadora (FAMEV-UFU)

Doutora Renata Cristina de Paula
Examinadora (ICBIM-UFU)

UBERLÂNDIA

2018

“Nós, seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar. Portanto quem chuta ou maltrata um animal é alguém que não aprendeu a amar”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade de estar aqui na Terra em busca da minha melhora espiritual e intelectual.

Aos meus pais Carmem e Jesualdo e aos meus irmãos Elieser e Júnior pelo amor, carinho, apoio e confiança.

À minha amiga, Tatiane Morilla por toda amizade, incentivo e carinho.

Ao Professor Sydnei por me receber como sua orientanda, pelos inúmeros ensinamentos, pela paciência, confiança, auxílio, compreensão e pela amizade.

À minha coorientadora Juliana Miranda, pelo apoio diário, pelos ensinamentos, paciência e amizade. Dificilmente conseguiria concluir este projeto sem toda sua ajuda, aprendi muito com você.

Ao pessoal do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania*, especialmente aos colegas: Iasmin, Marco, Karen, Douglas, Camila e Renata pela ajuda nesse projeto e pelos momentos de descontração.

A toda equipe do Hospital Veterinário da UFU pela parceria, paciência e apoio.

As professoras e doutoras Michelle, Alessandra e Renata participantes da banca examinadora que dividiram comigo este momento tão importante e esperado.

RESUMO

A leishmaniose é uma afecção de potencial zoonótico e de caráter peculiar em zonas rurais e centros urbanos. É uma enfermidade de difícil controle e grande enfoque na medicina veterinária, responsável por manifestações clínicas graves, sendo o diagnóstico parte fundamental para o estabelecimento de prognóstico e tratamento apropriados e prevenção de novos casos. A detecção do DNA do parasita auxilia no diagnóstico e possibilita o tratamento mais rápido e adequado, permitindo assim a melhora da qualidade de vida do animal. Nesse trabalho foi realizado um estudo da taxa de positividade em animais assintomáticos de diferentes idades, ambos os sexos e todas as raças, para leishmaniose atendidos pelo programa de castração voluntária do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV-UFU) no período de agosto a novembro de 2017. Foram coletadas 50 amostras de sangue, sendo que a detecção do DNA para o gênero do parasita foi realizada por PCR direcionada ao gene que codifica a enzima de choque térmico 70kDA e outro para região espaçadora transcrita interna do gene do RNA ribossomal. Desta análise foi verificada a positividade de 26% animais para ambos os pares de iniciadores, indicando uma provável infecção pelo parasito, sem a predisposição racial, sexual ou etária.

Palavras chave: Leishmaniose canina; Diagnóstico molecular; Iniciadores HSP70; Iniciadores LIST/L5.8S.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a zoonotic potential of a peculiar character in rural areas and urban centers. It is a disease of difficult control and great focus in veterinary medicine, responsible for serious clinical manifestations, being the diagnosis fundamental for the establishment of appropriate prognosis and treatment and prevention of new cases. The detection of DNA from the parasite helps in the diagnosis and allows the treatment more rapid and adequate, thus allowing the improvement of the quality of life of the animal, besides minimizing the possibility of becoming a reservoir of the disease. In this work, a study of the positivity rate was performed in asymptomatic animals of different ages, both sexes and all races, for leishmaniasis treated by the voluntary castration program of the Veterinary Hospital of the Federal University of Uberlândia (HVET-UFU) from August to November 2017. Fifty blood samples were collected, and the DNA detection for the genus of the parasite was performed by PCR directed to the gene that encodes the 70kDA heat shock enzyme and another to the internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA gene. From this analysis, the positivity of 26% of the animals was verified for both pairs of primers, indicating a probable infection by the parasite, without racial, sexual or age predisposition.

Keywords: Canine leishmaniasis; Molecular diagnosis; HSP70 primers; LIST / L5.8S primers.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Leishmaniose visceral canina.....	11
2.2 Agentes etiológicos	12
2.3 Ciclo biológico	13
2.4 Sinais clínicos.....	15
2.5 Diagnóstico.....	16
2.5.1 Diagnóstico parasitológico	17
2.5.2 Diagnóstico imunológico.....	17
2.6 Tratamento.....	20
2.7 Controle.....	21
3. JUSTIFICATIVA.....	23
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivos gerais.....	23
4.2 Objetivos específicos	23
5. MATERIAIS E MÉTODOS	24
5.1 Critérios éticos e seletivos.....	24
5.2 Coleta de amostras	24
5.3 Extração de DNA.....	24
5.4 Análise molecular	25
5.5 Eletroforese.....	26
5.6 Análise estatística	27
6. RESULTADOS	28
6.1 Dados epidemiológicos	28
6.2 Análise molecular.....	28
6.3 Análise estatística.....	29

7. DISCUSSÃO.....	32
8. CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36
9. ANEXOS.....	44
9.1 Anexo 1.....	45
9.2 Anexo 2.....	46

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, o animal doméstico que mais associou-se ao ser humano foi o cão, com o surgimento dessa relação há mais de 15.000 anos (THALMANN et al., 2013). No decurso da trajetória evolutiva, houve o estreitamento gradativo desse vínculo, que resultou em cruzamentos seletivos para ressaltar as características mais desejáveis, gerando uma espécie com inúmeras transformações morfológicas, fisiológicas e comportamentais que compõem os padrões de raças atuais (LINHARES et al., 2018).

Os cães exercem abundantes funções além das que exerciam em períodos remotos, sendo vistos como membros da família, companhia, símbolos de status, assistência a deficientes físicos, atuando também como terapeutas, com auxílio de imensa importância na saúde física e mental do ser humano (TATIBANA et al., 2009).

A alteração do panorama epidemiológico quanto a morbidade e mortalidade de cães, deve-se também a melhoria das condições socioeconômicas da população brasileira, entretanto, as doenças infecciosas continuam sendo a principal causa de morte entre os animais (TRAPP et al., 2010). Dentre elas, destacam-se as protozoonoses, que são afecções de enorme importância na clínica veterinária, principalmente as transmitidas por vetores, estando em evidência babesiose, toxoplasmose, neosporose e leishmaniose, sendo de difícil controle devido ampla distribuição geográfica dos parasitos e dos vetores (GUIMARÃES et al., 2009).

As afecções transmitidas por artrópodes são de relevância para a saúde humana e animal no mundo todo, em consequência dos numerosos agentes infecciosos que resultam em enfermidades diversas (HARRUS et al., 2006). Dentre as doenças emergentes transmitidas por vetores em cães, evidencia-se a leishmaniose causada por parasitos do gênero *Leishmania* e transmitida por flebotomíneos (OLIVEIRA et al., 2008).

A presença de enfermidades concomitantes ou coinfeções são capazes de gerar dúvidas no momento do diagnóstico clínico e dificuldades no tratamento, além disso, podem ter a sintomatologia clínica agravada, pois esses parasitos têm notável competência e mecanismos diversos para suprimir e/ou desviar a resposta imune do hospedeiro (SOUSA, 2012).

A diversidade de sintomas apresentados por cães positivos para leishmaniose torna-se um problema para o médico veterinário, variando de animais assintomáticos até estágios mais graves. A confirmação do diagnóstico consiste no histórico de exposição ao vetor, sinais clínicos compatíveis e exames laboratoriais citológicos, moleculares e sorológicos (FARIA, 2012). Um dos principais fatores que influenciam na precisão do diagnóstico para leishmaniose são as coinfeções e/ou reações cruzadas com outros patógenos (SILVA, 2011).

A presente pesquisa teve como objetivo diagnosticar a presença de *Leishmania infantum* em cães atendidos pelo programa de castração voluntária do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, por meio de técnica molecular, verificando a ocorrência de infecções.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leishmaniose visceral canina

A leishmaniose visceral é causada, principalmente, por duas espécies *Leishmania (Leishmania) donovani (L. donovani)* e *Leishmania (Leishmania) infantum (L. infantum)*, sendo a primeira encontrada nos continentes europeu, asiático e africano, afetando especialmente a população pobre, que se encontra na zona rural do Nordeste Indiano e Leste de África, e a segunda nos continentes já mencionados, além das Américas (ALVAR et al., 2012). Grande parte dos casos da doença provocada por *L. donovani* estão relacionados com infecção antroponótica, ou seja, o ser humano é o único reservatório. Já a *L. infantum* é antropozoonótica, não apenas na região mediterrânea, seu provável local de origem, como também na América Latina (LUKES, 2007).

Ambas as espécies são responsáveis pela infecção de aproximadamente 400 mil pessoas e morte de outras 40 mil por ano, estando entre as seis endemias prioritárias no mundo, tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade (WHO, 2010). Na América Latina, há relatos da enfermidade em inúmeros países, entretanto 90% dos casos ocorrem no Brasil, principalmente na região Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

No Brasil, a leishmaniose visceral apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais distintos, resultante de sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste. A partir de dados epidemiológicos

observou-se uma periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se surtos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Esse protozoário é transmitido para o hospedeiro vertebrado pela picada de flebotomíneos infectados, durante o repasto sanguíneo, sendo a espécie de maior importância epidemiológica no país a *Lutzomyia longipalpis* (LAISON et al., 2005). A leishmaniose visceral afeta tanto ser humano como o cão, que é o principal reservatório urbano, sendo responsável pela manutenção do parasito nos focos regionais (DANTAS-TORRES, 2010). A infecção canina precede a humana, com altas taxas de prevalência, podendo acometer até 80% de toda população canina de áreas endêmicas (BANETH et al., 2008).

A urbanização e o desmatamento são os principais responsáveis pela mudança na alteração da dinâmica da doença (BREARLEY et al., 2012), além da alta capacidade de adaptação de determinados flebotomíneos a mudanças ambientais e a interferência de outros animais domésticos, que também atraem o vetor e contribuem para o aumento do risco de infecção tanto em cães como em humanos (ALMEIDA et al., 2012).

2.2 Agentes etiológicos

Os protozoários heteroxênicos do gênero *Leishmania* pertencem a ordem Kinetoplastidae e a família Tripanosomatidae, a qual possui dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, apresentando grande distribuição pelos trópicos (WHO, 2010).

O subgênero *Viannia* é limitado a região neotropical no novo mundo, que compreende o México, Península da Baixa Califórnia, Sul da Flórida, Ilhas do Caribe e América do Sul. Já o subgênero *Leishmania* está presente nas regiões do velho mundo como a Paleártica que compreende a Europa, Norte da África, grande parte da Arábia e Ásia, além de ocorrer também no novo mundo (KERR, 2000).

Incorporado ao subgênero *Leishmania* destacam-se os complexos *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica* e *Leishmania (Leishmania) mexicana*. A leishmaniose cutâneo-difusa é associada a espécie *Leishmania*

(*Leishmania mexicana*, as demais espécies desse subgênero, como *Leishmania (Leishmania) infantum* estão associadas à forma clínica visceral (CUPOLILLO et al., 2014).

O subgênero *Viannia* tem como principais representantes complexos *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*, responsáveis por causar a forma clínica cutânea, cutâneo-difusa e mucocutânea (CUPOLILLO et al., 2014). Embora haja definições entre as espécies e formas clínicas, algumas que estão relacionadas a forma cutânea, como por exemplo a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, foram encontradas em vísceras, ressaltando a possibilidade de visceralização dessa espécie (OLIVEIRA, 2018).

2.3 Ciclo biológico

Os protozoários do gênero *Leishmania* são heteroxênicos, necessitam de um hospedeiro invertebrado e um vertebrado para completar o seu ciclo biológico. Multiplicam-se por divisão binária, possuindo duas formas evolutivas: a promastigota, com formato alongado e flagelo visível, encontrando-se no tubo digestório do hospedeiro invertebrado, e a forma amastigota, com formato ovalado, sem flagelo aparente, com desenvolvimento intracelular obrigatório nos hospedeiros vertebrados (BATES, 2008).

Os hospedeiros invertebrados de *Leishmania* são dípteros conhecidos como flebotomíneos, onde se evidenciam os gêneros *Phlebotomus*, encontrados no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (SHARMA et al., 2008). Há aproximadamente 60 espécies que transmitem o parasita, entretanto a espécie *Lutzomyia longipalpis* destaca-se como principal transmissora das formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania (L.) infantum* no Brasil (SILVA, 2017), e o *Lutzomyia cruzi*, atribuído como vetor no Estado de Mato Grosso do Sul (MISSAWA et al., 2001).

O ciclo de *Leishmania* inicia-se quando a fêmea do inseto vetor realiza o repasto sanguíneo em mamíferos infectados, a partir da introdução de suas peças bucais na pele do hospedeiro e com a movimentação das mesmas ocorre dilaceração dos tecidos, rompendo capilares sanguíneos, resultando na formação de poços compostos por sangue, linfa e debris de células, incluindo macrófagos e outros fagócitos com a forma amastigota presente em seus fagolisossomos, sendo o local de alimentação e infecção do flebotomíneo (BATES, 2015).

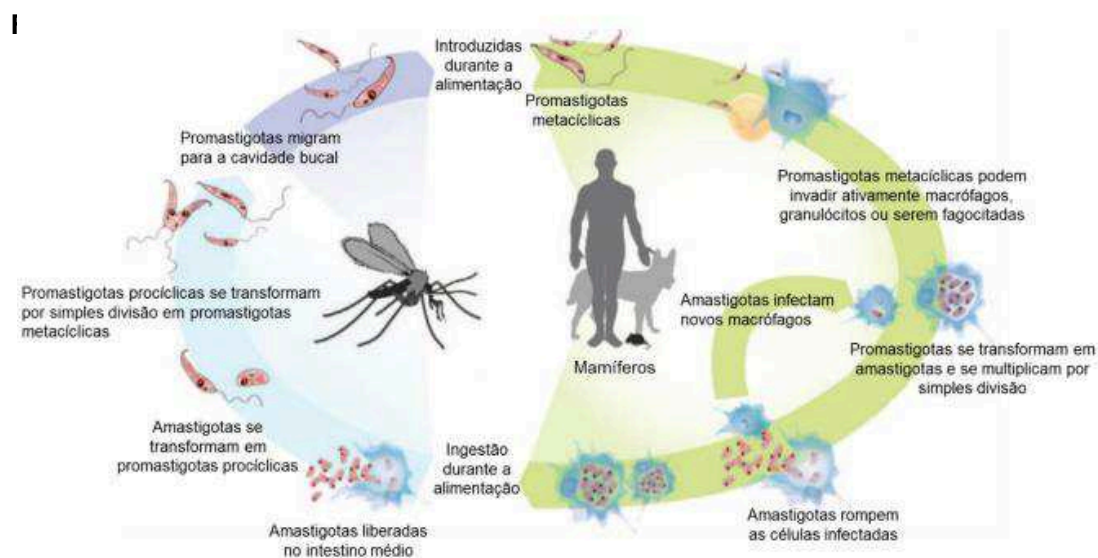


Figura 1 - Representação do ciclo de vida de *Leishmania* spp (Adaptado de HARHAY et al., 2011). Os flebotomíneos ingerem células infectadas durante o repasto sanguíneo. No intestino médio do vetor, formas amastigotas se transformam em promastigotas, por simples divisão, se desenvolvem e migram para a probóscide. Durante o repasto sanguíneo as promastigotas são regurgitadas em hospedeiros humanos ou mamíferos vertebrados. As promastigotas são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas e se transformam dentro dessas células em amastigotas, que se multiplicam por divisão simples e passam a infectar outras células fagocíticas mononucleares.

No tubo digestivo do vetor, há o rompimento dos macrófagos ingeridos e liberação dos parasitas, que se modificam em formas pequenas, ovais, flagelo curto e movimentação lenta, chamadas de promastigotas procíclicas. No período de 24 a 48 horas, essas formas sofrem inúmeras divisões binárias. Após intensa multiplicação e cerca de 48 a 72 horas, ocorre a transformação para formas alongadas, finas, com alta motilidade, denominadas de nectomonas, que promovem a degradação da matriz peritrófica. Estas formas migram para a porção anterior do intestino médio do inseto, aderindo-se pelo flagelo às microvilosidades intestinais, posteriormente, entre 4 a 7 dias, as nectomonas dão origem às leptomonas que passam por uma segunda etapa de proliferação no tubo digestivo do inseto. Por volta de 5 a 7 dias, duas formas são encontradas colonizando a região da válvula do estomodeu: promastigotas haptomonas e metacíclicas. As primeiras possuem flagelo curto e imóvel, que rapidamente se transformam em formas livres, finas,

curtas, altamente ativas e com flagelo longo, denominadas promastigotas metacíclicas. Estas são capazes de infectar o hospedeiro vertebrado e migram pela válvula do estomodeu para o esôfago, faringe e probóscide. Ao realizar um novo repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado susceptível, as formas infectantes são regurgitadas e inoculadas diretamente da probóscide, juntamente com a saliva do vetor (BATES, 2008; KAMHAWI, 2006; HARHAY et al., 2011).

Após a infecção do hospedeiro vertebrado, os macrófagos atraídos pela reação inflamatória formada no local fagocitam os parasitos, que são internalizados no vacúolo parasitóforo, que se liga aos lisossomos, dando origem ao vacúolo fagolisossomal. No interior deste vacúolo, o parasito permanece em um ambiente hostil, contendo enzimas lisossomais e metabólitos reativos do oxigênio. Entre uma a quatro horas, as formas promastigotas se transformam em amastigotas, iniciando uma reprodução por divisão binária dentro do vacúolo parasitóforo. Quando os macrófagos estão repletos com amastigotas, eles se rompem e liberam os parasitos que vão infectar outros macrófagos (PETERS et al., 2008; SACKS & SHER, 2002).

Há diversos fatores que garantem o sucesso da infecção no hospedeiro invertebrado, dentre eles, a capacidade do parasita de sobreviver à atividade de enzimas digestivas e de não ser eliminado no final da digestão do sangue (RAMALHO-ORTIGAO et al., 2010). Assim, sabe-se que a promastigota procíclica possui em sua superfície moléculas de lipofosfoglicanos (LPG), que interagem com lecitinas presentes no tubo digestório do inseto, impedindo que seja eliminado no final da digestão do alimento, juntamente com a proteína flagelar FLAG1/SMP1 que também exerce um papel de adesão (DI-BLASI et al., 2015).

A promastigota metacíclica expressa em sua superfície grande quantidade de LPG e GP63, sendo a segunda uma metaloprotease que interage com as proteínas tirosinas fosfatases dos macrófagos, agindo como repressor de vias imunológicas, resultando em uma imunossupressão do hospedeiro vertebrado (BLANCHETTE et al., 1999). A atuação em conjunto promove uma proteção do parasito contra ação de enzimas líticas no hospedeiro invertebrado (OLIVER et al., 2005).

2.4 Sinais clínicos

A leishmaniose visceral canina é uma doença sistêmica, com uma ampla variedade de sinais clínicos inespecíficos, com manifestações que vão desde as formas mais brandas até quadros mais graves, podendo levar o paciente a óbito

(BRASIL, 2014). A sintomatologia está relacionada com a resposta imune do animal e complexos mecanismos patogênicos que ocorrem nos diversos órgãos (SOLANO-GALLEGO et al., 2009), outros fatores como a idade, estado nutricional e genética são determinantes na expressão da enfermidade no organismo do cão (DAVIES et al., 2000).

O acometimento do tecido cutâneo é o sinal clínico mais comum, acredita-se que entre 60% e 90% dos cães infectados apresentam algum tipo de alteração dermatológica. Dentre as lesões mais frequentes são dermatites pruriginosas, seborreicas ou esfoliativas, principalmente ao redor dos olhos, orelhas e membros, podendo estar associado a alopecia. Acredita-se que estes danos não são causados necessariamente pela resposta inflamatória devido à presença física do protozoário no local, pois peles aparentemente saudáveis foram encontradas com grande quantidade de parasitos (BANETH et al., 2008).

Em fases mais adiantadas da doença, os achados clínicos mais comuns são linfadenomegalias, esplenomegalia, hepatomegalia, hipertermia, onicogribose, oftalmopatias, nefropatias, anorexia, atrofia, muscular, coagulopatias e comprometimento das articulações e ossos (BANETH et al., 2008; SANTANA et al., 2008; LINHARES et al., 2005).

No Brasil, a forma assintomática é encontrada com altos índices, variando de 40% a 60% dos animais diagnosticados positivos a partir de exames complementares (BRASIL, 2014). Estes animais são de extrema importância para epidemiologia da doença, mesmo sem nenhuma apresentação clínica, são fontes de infecção para os flebotomíneos, e conseqüentemente, participam ativamente da transmissão de *Leishmania infantum* (PALATNICK et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2010).

2.5 Diagnóstico

A ausência de alterações patognomônicas e o fato de os sinais clínicos poderem mimetizar outras doenças, impossibilita o diagnóstico ser exclusivamente pelo exame físico, além disso, há um alto percentual de animais que não apresentam nenhum sinal clínico da doença. Por estes motivos, os exames complementares tornam-se indispensáveis no diagnóstico de leishmaniose visceral canina (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Embora seja impossível a determinação do diagnóstico para enfermidade apenas pelo exame físico, é de extrema importância a sua realização de maneira minuciosa, além dos testes laboratoriais de rotina, como hemograma completo, urinálise e provas bioquímicas (ALVAR et al., 2004).

Estes três últimos exames têm baixa contribuição para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, entretanto, fornecem informações valiosas sobre o estado clínico do animal infectado, sendo possível estimar o prognóstico e evolução da doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

2.5.1 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico é obtido pela visualização direta das formas amastigotas do parasito, confirmando a infecção. A avaliação pode ser feita em material de medula óssea, pele, linfonodo, baço e fígado, podendo realizar a confecção de esfregaços ou *imprints* em lâminas, exame histopatológico, incubação em meio de cultura ou em animais de laboratório (GONTIJO et al., 2004).

As principais vantagens do método parasitológico são: baixo custo, praticidade e ainda continua sendo o meio com especificidade de 100%, entretanto a sua sensibilidade pode variar de acordo com a intensidade parasitária, tipo de material analisado, podendo ser de 50% a 83% em amostras de medula óssea, entre 30% e 85% em amostras de linfonodo e entre 71% a 91% quando há combinação de tecidos (FERRER, 1999; KOUTINAS et al., 2001), além número de campos observados ao microscópio e experiência do examinador (GIUDICE et al., 2011; DANTAS- TORRES, 2006).

2.5.2 Diagnóstico imunológico

O diagnóstico imunológico é baseado na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. ou de antígenos do parasito (BRASIL, 2014). Os animais têm níveis detectáveis de anticorpos anti-*Leishmania* spp. três meses após a infecção, e podem permanecer por até dois anos (MARCONDES et al., 2011). Acredita-se que cães com baixos níveis de anticorpos tiveram uma exposição prévia ao protozoário, e que geralmente não desenvolvem a doença clínica, tornando-se portadores assintomáticos, porém a persistência da infecção pode gerar aumento gradativo do nível de anticorpos ao longo do tempo. Já altos níveis de anticorpos, frequentemente

estão associados a doença clínica e alta carga parasitária no animal, fechando do diagnóstico para infecção (BANETH et al., 2008).

Dentre as diversas técnicas sorológicas empregadas, destacam-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA). No Brasil, são os métodos mais utilizados no diagnóstico de leishmaniose visceral humana e canina, sendo que o ELISA tem sido o teste de escolha para inquéritos populacionais (MELO, 2004).

A RIFI é uma técnica que utiliza o parasito em sua forma íntegra como antígeno, entretanto, as principais desvantagens estão relacionadas a necessidade de um alto nível de habilidade e experiência, equipamentos especializados e de elevados custos, além de ser extremamente laborioso, dificultando a sua utilização na triagem de um grande número de amostras (FARIA et al., 2012). Sua sensibilidade varia de 83% a 100% e sua especificidade é de aproximadamente 80% para amostras de soro (ALMEIDA, et al., 2005; LIRA, 2005). Entretanto, esse método pode apresentar reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, como no caso das espécies de *Leishmania* responsáveis pelas formas tegumentares e do *Trypanosoma cruzi* (MARCONDES et al. 2011).

O ELISA tem aplicação tanto para diagnóstico individual de leishmaniose visceral canina, quanto para triagem envolvendo grande número de amostras, devido a facilidade da técnica, além da grande variedade de antígenos, podendo utilizar antígenos brutos, sintéticos ou recombinantes. Este método baseia-se na reação de anticorpos presentes no soro com o antígeno de *Leishmania* adsorvido em microplacas, cuja reação final é medida por espectrofotometria (MAIA et al., 2008). Os antígenos brutos fornecem

Segundo DANTAS-TORRES (2005b), ambos testes sorológicos apresentam limitações, e estas devem ser levadas em consideração ao longo da interpretação do resultado obtido, uma resposta positiva indica uma exposição prévia ao parasito, porém não confirma a doença e nem a infecção.

1.5.3. Diagnóstico molecular

Os métodos diagnósticos utilizando o DNA estão sendo explorados intensamente com objetivo de superar as diversas limitações apresentadas pelos

testes convencionais de rotina. Dentre estes, encontra-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), que se baseia na amplificação de uma sequência conhecida de oligonucleotídeos específicos do patógeno, sendo um método altamente sensível e específico para *Leishmania*. Sua sensibilidade está diretamente relacionada ao alvo, e conseqüentemente ao número de cópias de DNA amplificado (GOMES et al., 2008).

Distintas sequências do genoma de *Leishmania* spp. estão sendo usadas pelos pesquisadores como iniciadores nessas reações de amplificação, como os direcionados para os genes que codifica a enzima G6PHD, o gene de mini-exon transcritos do rDNA-ITS1, ou o gene que codifica a proteína do choque térmico HSP70 (CASTILHO et al., 2008; SCHONIAN et al., 2003; GARCIA et al., 2004).

Nas Américas, destaca-se o diagnóstico parasitológico molecular direcionada ao kDNA (DNA de cinetoplasto), uma molécula que contém aproximadamente 10.000 minicírculos naturalmente amplificados, resultando em uma melhor sensibilidade da técnica (WEIRATHER, et al., 2011).

Uma das grandes vantagens da utilização deste método no diagnóstico para leishmaniose visceral canina é a possibilidade da utilização de uma grande variedade de materiais clínicos, não sendo necessário o uso de técnicas invasivas, como biópsia de medula óssea ou de fígado, punção de baço, aspirado de linfonodo ou até mesmo grande volume de sangue para obtenção de material biológico analisado (MANNA, 2004).

A PCR em tempo real (qPCR) é um procedimento que permite o monitoramento contínuo, por meio de sondas fluorescentes, da amplificação do DNA específico enquanto a reação ocorre. Em comparação com a PCR convencional, a qPCR é mais sensível e tem menores chances de contaminação, além de tempo de realização ser menor (MAIA et al., 2008). A execução da qPCR é menos laboriosa e mais prática, além da possibilidade de ser automatizada, permitindo a análise de grandes números de amostras em estudos epidemiológicos (JULIÃO et al., 2011).

Há fatores que interferem na sensibilidade e especificidade do teste, como o protocolo de extração do DNA utilizado, tipos de amostras biológicas, os oligonucleotídeos iniciadores escolhidos, como também o tempo de infecção (LACHAUD et al., 2002).

Moreira et al., (2007) compararam a eficácia dos métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares no diagnóstico de cães com variados sinais clínicos. A

PCR demonstrou sensibilidade de 95% a 100%, mostrando ser a mais sensível das técnicas utilizadas, indicando ser um método muito eficiente para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina.

Uma das maiores dificuldades da técnica molecular é a padronização, resultando em um obstáculo na utilização da PCR como método alternativo para o diagnóstico de uma determinada patologia. Essa dificuldade está relacionada com a diferença de eficiência das inúmeras polimerases, presença de inibidores nas amostras biológicas, além da variação de desempenho de termocicladores (HOORFAR et al., 2002). Logo, para que a PCR forneça resultados confiáveis é necessário ensaios de padronização e a validação da metodologia, a partir de estudos experimentais e cumprimento das exigências das aplicações analíticas, para garantir a confiabilidade dos resultados (MALORNY et al., 2003).

A necessidade de laboratórios bem equipados e habilidade técnica são as principais desvantagens da técnica molecular. Apesar do custo ainda ser alto para realização da PCR, é notável o aumento de demanda, e com isso, há possibilidade de redução dos custos, tornando-a mais acessível (BRASIL, 2006).

2.6 Tratamento

Perante a legislação brasileira, a leishmaniose é uma doença de notificação obrigatória regido pelo decreto do Senado Federal nº 51.838, de 14 de março de 1963. Incluso nas normas técnicas do mencionado decreto para o combate à leishmaniose visceral humana, ressalta-se o Artigo 3º “O Departamento Nacional das Endemias Rurais executará as seguintes medidas profiláticas: a) investigação epidemiológica; b) inquéritos extensivos para descoberta de cães infectados; c) eliminação dos animais domésticos doentes; d) campanhas sistemáticas contra os flebótomos nas áreas endêmicas; e) tratamento dos casos humanos”; e o Artigo 9º “Os cães encontrados doentes deverão ser sacrificados, evitando-se, porém, a crueldade”. Posteriormente, a doença foi introduzida no contexto das legislações estaduais e municipais sobre zoonoses, estabelecendo que os animais assintomáticos, porém soropositivos, além dos que se apresentavam com sintomatologia clínica, deviam ser eutanasiados, resultando no desencorajamento dos médicos veterinários a iniciar um tratamento para os animais infectados (BRASIL, 2014; BRASIL, 1963).

A eliminação de animais infectados pode afetar positivamente a transmissão da doença, resultando na possível redução da incidência da leishmaniose visceral canina e humana. Entretanto, mesmo com a realização do sacrifício dos animais soropositivos, a doença continua sendo transmitida, sugerindo a possibilidade de outros reservatórios silvestres ou domésticos envolvidos na disseminação da doença (ASHFORD et al., 1998).

Após inúmeros questionamentos sobre a eficiência da eutanásia como medida de combate a transmissão da leishmaniose visceral, foi aprovado o projeto de lei que autoriza o tratamento de cães contra o protozoário causador da doença. Todavia, os medicamentos humanos não devem ser utilizados em cães como método terapêutico, devido sua baixa eficácia parasiticida neste hospedeiro, resultando em uma possível seleção de parasitos resistentes (WHO, 2010).

O único fármaco com eficácia comprovada para o tratamento da doença em cães é a miltefosina (MONGE-MAILLO et al., 2015). O principal efeito colateral do medicamento é a teratogenicidade, além de alterações gastrointestinais, sendo transitórios ou reversíveis, não promovendo cura parasitológica (SUNDAR et al. 2007).

No Brasil, a utilização da droga passou a ser permitida apenas para o tratamento de cães, liberado em 2016 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), não sendo recomendado pelo Ministério da Saúde e não permitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para tratamento da leishmaniose visceral humana (MORAIS, 2016).

Entretanto, é necessário destacar que o tratamento dos animais infectados não configura uma medida de saúde pública para a doença, já que pode até resultar no desaparecimento dos sinais clínicos, porém estes cães continuam como fonte de infecção para o vetor, e conseqüentemente, um risco para a população humana e canina (PORTELLA, 2018).

2.7 Controle

O programa de controle para leishmaniose visceral consiste no controle do vetor flebotomíneo por meio de inseticidas de ação residual, eutanásia de cães soropositivos e/ou parasitológico positivo (esta estratégia não conseguiu impedir o aumento do número de casos da doença em humanos e cães), além do tratamento dos pacientes infectados (BRASIL, 2014).

No Brasil, há industrialização e comercialização de vacinas licenciadas pelo MAPA para imunização de cães contra o protozoário, sendo capaz de proteger de 92% a 95% dos animais vacinados (BORJA-CABRERA, 2002). Além de outras medidas profiláticas alternativas como a utilização de inseticidas tópicos e uso de coleiras com inseticidas (WERNECK, 2014).

A orientação da população sobre posse responsável é indispensável para o controle da leishmaniose visceral, pois a adoção de medidas que resultem no bem-estar animal, a fim de evitar os maus tratos e abandono, contribuem com a diminuição da expansão de zoonoses como esta (SANTOS et al., 2014).

3 JUSTIFICATIVA

As confirmações diagnósticas para leishmaniose visceral canina são problemáticas para o médico veterinário, correspondente a abrangência e ausência de sintomatologia que caracterizem a doença, além das limitações dos testes utilizados na rotina de clínicas e hospitais veterinários. Outro agravante para o diagnóstico da doença, é a alta taxa de animais assintomáticos, que mesmo não apresentando indícios de alterações homeostáticas, estão infectados, contribuindo para a manutenção do parasito. O estreitamento das relações entre o cão e homem colabora de maneira significativa para a propagação de doenças com caráter zoonótico, explicitando a necessidade de métodos diagnósticos eficientes para animais infectados sintomáticos ou assintomáticos, e conseqüentemente, posteriores medidas terapêuticas adequadas e implantação de estratégias profiláticas.

A relevância do projeto está em realizar o diagnóstico molecular para *Leishmania* spp., sendo um método pouco utilizado na rotina de hospitais veterinários públicos e particulares. Logo, oferecer um serviço à população empregando uma técnica com alta sensibilidade e especificidade, para garantir um resultado confiável, que proporcione um protocolo de tratamento adequado, possibilitando assim o bem-estar do animal e redução das chances de infecção humana.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Determinar a frequência de *Leishmania* spp. em cães atendidos pelo programa de castração voluntária do hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV-UFU).

4.2 Objetivos específicos

- Determinar a positividade para *Leishmania* spp. nos cães atendidos pelo programa de castração voluntária HV-UFU no período de agosto a novembro de 2017 por meio da técnica PCR;
- Comparar os resultados obtidos de cada par de iniciadores utilizados na técnica de PCR.

- Relacionar a positividade apresentada pela PCR com as variáveis sexo, idade e raça.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Critérios éticos e seletivos

Todos os procedimentos de manipulação dos animais estavam de acordo com os princípios éticos da experimentação animal e seguiram as diretrizes recomendadas pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal - CEUA/UFU. Este projeto foi aprovado pelo CEUA/UFU sob protocolo nº 150/16 (Anexo 1).

Os animais incluídos nesse estudo (n = 50) tiveram o prévio consentimento dos tutores sendo os mesmos esclarecidos e convidados a participar do projeto e a autorização para a coleta das amostras foi feita por meio do termo de consentimento (Anexo 2), sendo os mesmos esclarecidos e convidados a participar da pesquisa. Cães de todas as raças, ambos os sexos e diferentes faixas etária, atendidos pelo programa de castração voluntária do HV-UFU no período de agosto a novembro de 2017. Desses pacientes obtiveram-se as seguintes informações: idade, sexo, raça e data do atendimento.

5.2 Coleta de sangue

Os animais assintomáticos para leishmaniose avaliados no HVET-UFU atendidos no período entre agosto e novembro de 2017, receberam número individual e foram identificados pelo número da ficha clínica registrada no HVET-UFU. Após o procedimento de esterilização cirúrgica, foram coletados 5 mL de sangue por punção venosa das veias cefálica, jugular ou safena lateral, por meio de agulha e seringa descartáveis, e transferido para tubos a vácuo estéreis contendo EDTA, previamente identificados. Essas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas - UFU e mantidas à -20° C até serem processadas para a realização do diagnóstico molecular.

5.3 Extração de DNA

As extrações de DNA a partir de sangue coletado com EDTA foram realizadas utilizando o Kit DNeasy Blood & Tissue Kit® (PROMEGA) de acordo com as instruções do fabricante, sendo que foram usados 100µL do sangue coletado.

Posteriormente, o DNA foi dosado por espectrofotometria (NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers) e conservado a - 20° C até a análise molecular.

5.4 Análise molecular

O DNA extraído das amostras de sangue coletadas foi submetido à análise molecular utilizando dois pares de iniciadores que amplificam sequências conservadas de genes das espécies do gênero *Leishmania*. Os iniciadores HSP70 direto e reverso amplificam um fragmento de 234 pb da proteína de choque térmico 70kDA de *Leishmania* como descrito por Graça et al. (2012); e os iniciadores LITSR / L5.8S descritos por Schönian et al. (2003), amplificam um fragmento de 300-350 pb da região espaçadora transcrita interna do gene do RNA ribossomal.

As PCRs foram feitas em um volume final de 25 µL para ambos pares de iniciadores, e foram realizadas em termociclador (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific Inc, EUA) seguindo as condições descritas na Tabela 1.

Em todas as reações, o DNA de *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46), obtido a partir de cultura axênica, foi utilizado como controle positivo. Como controle negativo das reações foi empregado amostra de DNA de um cão de 7 meses da raça pug pedigree CBKC, o qual utiliza constantemente coleira antiparasitária (Leevre, Ouro Fino) e que apresentou resultados negativos pelas técnicas de pesquisa do parasito em esfregaço sanguíneo e molecular (PCR) para leishmaniose visceral canina, bem como água livre de nuclease para o branco.

Tabela 1: Iniciadores, alvo, tamanhos (pb) dos produtos amplificados e condições da reação de PCR para *Leishmania* spp., segundo Graça et al. (2012) e Schönian et al. (2003).

Iniciadores	Sequências (<i>foward e reverse</i>)	Alvo	Amplicon	Condições da reação
LITSR/L5.8S	F: 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3' R: 5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'	Sequência conservada da região espaçadora transcrita interna do gene do RNA ribossomal 1 (ITS1, do inglês <i>ribosomal internal transcribed spacer 1</i>) de <i>Leishmania</i> spp.	300-350pb	Desnaturação inicial a 95°C por 2min, seguido de 35 ciclos (95°C por 20seg, 56°C por 30seg, 72°C por 1min) e extensão final a 72°C por 6min
<i>hsp70</i> direto/reverso	F: 5'-GGACGAGATCGAGCGCATGGT-3' R: 5'-TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG-3'	Sequência conservada do gene de <i>Leishmania</i> spp. que codifica a proteína de choque térmico de 70 kDa (<i>Hsp70</i>).	234pb	Desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguido de 30 ciclos (94°C por 30seg, 61°C por 1min, 72°C por 30seg) e 72°C por 8min

5.5 Eletroforese

Após a PCR, os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 3% ou poliacrilamida 6%, juntamente com o padrão de peso molecular de 100pb (Ludwig Biotec, BR) e com tampão TBE 1X (Tris 89mM, ácido bórico 89mM e EDTA 2mM) durante 1h a 100V. Para visualização das bandas, os produtos de reação corridos em gel de agarose foram marcados com intercalante de DNA (Safer Dye - Kasvi, BR). Enquanto que, o gel de poliacrilamida foi fixado em solução de álcool etílico 10% v/v e ácido acético 0,5% v/v, corado em solução de nitrato de prata 0,1% p/v e revelado com auxílio de solução de hidróxido de sódio 3% p/v e formaldeído 3% v/v (GREEN; SANMBROOK, 2012).

5.6 Análise estatística

O cálculo das porcentagens das positivities foi feito pelo software Microsoft Office/Excel 2013. A relação entre as variáveis sexo, idade e raça e o resultado positivo do diagnóstico molecular para leishmaniose visceral canina foram analisadas por meio do teste do qui-quadrado, utilizando o programa Graphpad. As diferenças são consideradas significativas quando a probabilidade (P) da ocorrência do evento for inferior a 5% ($P < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 Dados epidemiológicos

As informações referentes a idade, sexo e raça dos 50 animais, participantes do estudo, foram obtidas por meio de questionário aplicado ao tutor logo após a assinatura do termo de esclarecimento e livre consentimento.

Quanto ao sexo dos animais incluídos no estudo, 33 (66%) cães eram fêmeas e 17 (34%) macho, com uma média de idade de 3,49 anos, sendo que 48 (96%) animais eram sem raça definida (SRD), e apenas 2 (4%) apresentavam padrões raciais de Poodle e Shih-tzu (Tabela 3).

Tabela 2: Dados demográficos dos 50 cães assintomáticos atendidos pelo programa de castração voluntária e submetidos a análise molecular para leishmaniose.

Sexo	Idade (anos)											Total
	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Fêmeas	2/33	7/33	3/33	8/33	6/33	3/33	2/33	1/33	1/33	0/33	0/33	33
Machos	1/17	1/17	3/17	6/17	2/17	1/17	1/17	1/17	0/17	0/17	1/17	17

6.2 Análise molecular

No presente estudo, determinou-se a positividade de 50 animais para leishmaniose visceral canina por meio da técnica PCR. A amplificação utilizando o par de iniciadores HSP70 gerou fragmentos de aproximadamente 240 pb para todas as amostras positivas (Figura 2). Entre as amostras testadas, 13 (26%) foram positivas e 37 (74%) negativas na PCR que utilizou estes iniciadores.

A amplificação da região ITS-1 gerou fragmentos de aproximadamente 350 pares de bases para todas as amostras utilizadas (Figura 3). Na PCR com o par de iniciadores LITSR / L5.8S 13 (26%) amostras foram positivas e 37 (74%) negativas.

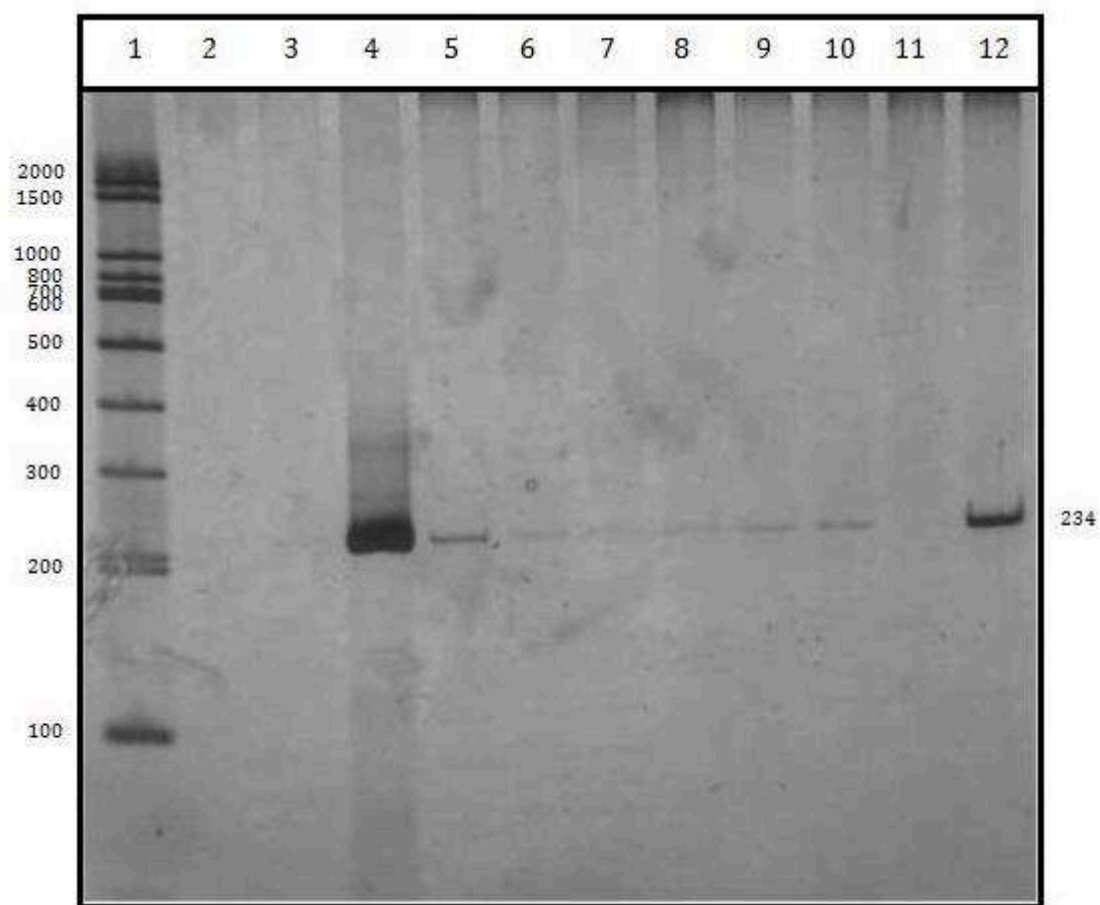


Figura 2. Análise molecular da amplificação com o iniciador HSP70 direto/HSP70 reverso em gel representativo de poliacrilamida 6% 1- Marcador de peso molecular. 2- Branco. 3- Controle Negativo. 4- Controle Positivo para *Leishmania infantum*. 5 a 12- Amostras de cães assintomáticos para leishmaniose canina.

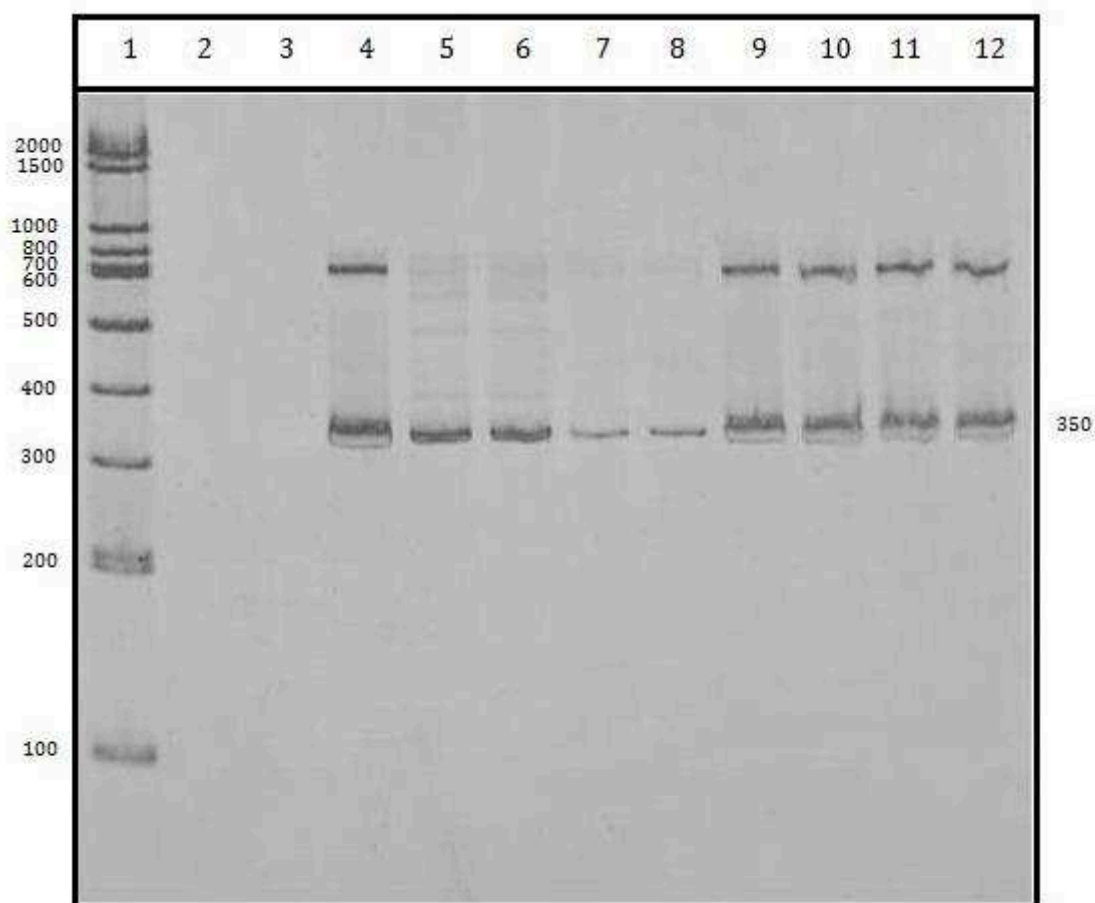


Figura 3. Análise molecular da amplificação com o iniciador LITSR / L5.8S em gel representativo de poliacrilamida 6%. 1- Marcador de peso molecular. 2- Branco. 3- Controle Negativo. 4- Controle Positivo para *Leishmania infantum*. 5 a 12- Amostras de cães assintomáticos para leishmaniose canina.

As amostras positivas para os iniciadores LITSR / L5.8S, foram as mesmas positivas para o HSP70 (Tabela 4).

Tabela 4: Frequência de cães positivos para leishmaniose testados por PCR com utilização dos iniciadores HSP70 e LITSR/L5.8S.

Resultado	PCR-HSP70	PCR-LITSR / L5.8S	Total
Positivo	13 (26%)	13 (26%)	50
Negativo	37 (74%)	37 (74%)	50

6.3. Análise Estatística

A variável sexo relacionada com a positividade determinada pela PCR apresentou no teste do qui-quadrado $p = 0,7$, a variável idade demonstrou $p = 0,5$ e a variável raça apresentou $p = 0,3$. A partir disso, conclui-se que, não há diferença de positividade em relação a nenhuma variável.

Tabela 5. Dados demográficos e positividade dos animais submetidos a análise molecular para os iniciadores HSP70 e LITSR/L5.8S, segundo as variáveis sexo, idade e raça.

Variáveis		Animais analisados				Valor de p
		Total (n)	%	n + (%)	n – (%)	
Sexo	Fêmea	33	74%	9 (27,7%)	24 (72,73%)	0,7
	Macho	17	26%	4 (23,52%)	13 (76,48%)	
Idade	Jovem	11	22%	2 (18,18%)	9 (81,82%)	0,5
	Adulto	39	78%	11 (28,20%)	28 (71,8%)	
Raça	Sim	2	4%	0	2 (100%)	0,3
	Não	48	96%	13 (27,08%)	35 (72,92%)	

7 DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral é uma das doenças mais negligenciadas do mundo, que afeta principalmente a população socioeconomicamente carentes, levando a óbito milhares de pessoas anualmente. Mesmo com os avanços científicos associados ao diagnóstico, tratamento e prevenção, as taxas de morbidade e mortalidade demonstram tendências ao crescimento (WHO, 2010).

É notório a grande relevância que o cão possui como reservatório de *Leishmania infantum*, sendo a leishmaniose canina uma das doenças parasitárias de maior importância no país. Diante disto, evidencia-se o papel que o cão possui como potencial fonte de infecção, resultante da sua crescente aproximação com as famílias (SILVA, 2011).

O diagnóstico para leishmaniose visceral canina é de grande importância, não apenas para direcionar um tratamento mais eficaz, como também para o controle desta nas áreas endêmicas. O tratamento baseia-se em um diagnóstico preciso, pois a identificação da espécie do parasito está relacionada com a evolução da doença (SCHÖNIAN et al, 2011).

As amostras de sangue dos 50 cães foram submetidas a PCR utilizando os iniciadores HSP70, que apresentou positividade para 13 (26%) animais, e para os iniciadores LITSR / L5.8S que mostrou positividade para 13 (26%) animais, que foram os mesmos positivos para os primeiros pares de iniciadores.

Os animais que apresentaram positividade para ambos iniciadores tinham em média 3 anos de idade, sendo 9 (69,3%) fêmeas e 4 (30,7%) machos, nenhum apresentava padrão racial. O grupo experimental não apresentava homogeneidade com relação ao sexo e raça, resultando em uma quantidade maior de animais do sexo feminino e a predominância de animais sem padrão racial. A avaliação estatística pode apresentar viés, uma vez que a população canina atendida no HV-UFU é composta, em sua grande maioria, por fêmeas.

Em inúmeros trabalhos científicos a susceptibilidade genética à leishmaniose vem sendo apontada, podendo variar entre diversas raças caninas (SANCHEZ-ROBERT et al., 2008). Quinnell et al., (2009) após compararem dados de cães infectados nos continentes europeu e sul-americano, propõem que o fator racial canino pode estar influenciando na susceptibilidade de determinados animais a

doença, além de interferir na resposta terapêutica sugerindo a existência de fatores genéticos raciais que modulam a progressão da doença.

Ciaramella et al., (1997) identificaram em um estudo com 150 cães infectados naturalmente na Itália, que os animais mais acometidos foram os sem raça definida, cães de caça e pastor alemão. Entretanto, outros trabalhos não encontraram correlação entre o surgimento da leishmaniose visceral e predisposição sexual, etária ou racial (DE ALMEIDA et al., 2012; FEITOSA et al., 2000; SANTOS et al., 2010).

Diante dos fatos apresentados acima, deve-se considerar que leishmaniose visceral canina é uma doença, na qual os fatores de riscos variam de uma região para outra, sendo necessário também observar o estilo de vida do cão em particular, podendo este ser mais exposto aos vetores, favorecendo a infecção (SANTOS et al., 2010; DANTAS-TORRES, 2009).

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas em relação à idade, raça e sexo, o que corrobora com dados de Feitosa et al., (2000) e Gontijo et al., (2004), já que não evidenciaram predisposição sexual, racial ou etária relacionada com a infecção.

A eficiência do método molecular para diagnóstico de leishmaniose visceral canina em animais assintomáticos foi o foco principal deste trabalho, além de ser considerado um método rápido vem sendo amplamente usado em diagnósticos de diversas doenças infecciosas, apresentando índices relevantes de sensibilidade e especificidade. A PCR tem apresentando resultados favoráveis na detecção do DNA de *Leishmania* e na discriminação da espécie do parasito envolvido na infecção (GARCIA et al., 2004; CASTILHO et al., 2003).

Monteiro (2014) fez PCR a partir da amplificação do DNA alvo para os pares de iniciadores HSP70 e LITS/L5.8S, utilizando amostras de fígado e linfonodos de 58 cães. Destes animais, 81% apresentaram resultado positivo para HSP70 e LITS/L5.8S, confirmando a presença do parasito e eficácia dos iniciadores utilizados.

Portella (2018) utilizou o diagnóstico molecular para 174 cães residentes de Itaipu, que deram entrada em uma determinada clínica veterinária por motivos diversos. As amostras de sangue foram submetidas o Teste Rápido

Imunocromatográfico DPP e a amplificação do DNA alvo para os pares de iniciadores kDNA e LITS. Para o teste DPP 4 amostras foram positivas, para o LITS apenas 1 amostra foi positiva, o kDNA confirmou a positividade das 5 amostras – 4 positivas pelo DPP e 1 pelo LITS. A PCR(LITS) não apresentou boa sensibilidade, diferentemente do PCR (kDNA).

Um dos grandes desafios é desenvolver e aplicar métodos que possuam boa sensibilidade para o diagnóstico de leishmanioses, e que permitam a discriminação da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção. Diversos métodos envolvendo a PCR tem sido aplicados para estas finalidades, buscando alvos distintos, como regiões do kDNA, sequências teloméricas, gp63, hsp70, gene ribossômico, entre outros (VEGA-LOPEZ, 2003). Dentre esses métodos, análise de RFLP do produto amplificado por PCR tem apresentados resultados promissores em diversos estudos (GARCIA et al., 2004).

Uma variedade de protocolos para detecção de *Leishmania infantum* tem sido feitos, e o método molecular tem apresentado alta sensibilidade e especificidade na detecção de infecções em animais assintomáticos ou com o exame parasitológico negativo (ASHFORD et al., 1995; AOUN et al., 2009).

A sensibilidade e especificidade da PCR estão ligados aos pares de iniciadores usados na amplificação do DNA alvo, ao número de cópias do DNA alvo a ser amplificado, ao método de extração de DNA utilizado, ao tipo de amostra biológica a ser analisada e ao protocolo de PCR (SALAM et al., 2010).

Entretanto, ainda não há uma padronização para o diagnóstico parasitológico molecular das leishmanioses, variando bastante com o grupo de pesquisadores e laboratórios envolvidos na pesquisa. No Brasil, a partir de uma observação das publicações disponíveis no PubMed, a PCR direcionada para amplificação da região conservada do minicírculo do kDNA e gene ribossômico são os métodos mais utilizados para diagnóstico molecular destas patologias (GRAÇA, 2011).

As reações de PCR convencional do presente estudo, foram feitas com iniciadores destinados para dois alvos diferentes, sendo um voltado para o gene que codifica a enzima de choque térmico 70kDA e outro para região espaçadora transcrita interna do gene do RNA ribossomal. Para os dois pares de iniciadores a sensibilidade e especificidade foram as mesmas, devido aos resultados de

positividade das amostras para ambos os iniciadores, indicando uma provável infecção desses animais pelo parasita.

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem uma contínua atenção sobre a importância dos cães assintomáticos atuando como reservatório doméstico da leishmaniose visceral. Neste sentido, é necessário empreender estudos com abordagens integradas, que contribuam para o planejamento e estratégias dos programas de controle, além da conscientização dos tutores por parte dos médicos veterinários da existência de medidas de prevenção do contato dos cães com os vetores, por meio de barreiras físicas como telas nos canis e barreiras químicas como o uso de repelentes e coleiras antiparasitárias, além da vacinação, considerando que o principal meio de transmissão é pela picada da fêmea do flebotomíneo.

8 CONCLUSÃO

- Obteve-se 26% de positividade para leishmaniose visceral canina em animais parentemente sadios;
- Não houve predisposição sexual, etária ou racial relacionadas com a infecção;
- A sensibilidade e especificidade dos dois pares de iniciadores utilizados na PCR foram iguais.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.B.P.F.; SOUZA, V. R. F.; CRUZ, F. A. C. S.; DAHROUG, M. A. A.; FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. F. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 359–365, 2012.

ALMEIDA, M. A.; JESUS, E. E.; SOUSA-ATTA, M. L. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**. 127(3-4):227-32, 2005.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p.1-12, 2012.

AOUN, O.; MARY, C.; ROQUEPLO, C.; MARIE, J.L. Canine leishmaniasis in south-east of France: screening of *Leishmania infantum* antibodies (Western blotting, ELISA) and parasitaemia levels by PCR quantification. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 27–31, 2009.

ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, M. C.; SAMPAIO, D. P.; BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 53–57, 1998.

ASHFORD, D.A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J. C. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 251-255, 1995.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. **Veterinary Journal**, v.75, n.1, p. 14-15, 2008.

BATES, P. A. Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. **Current Opinion Microbiology**, v.11, p. 340-344, 2008.

BATES, P. A.; DEPAQUIT, J.; GALATI, E. A.; KAMAHIWI, S.; MAROLI, M.; MCDOWELL, M. A.; PICADO, A.; READY, P. D.; SALOMON, O. D.; SHAW, J. J.;

TRUB-CSEKO, Y. M.; WARBURG, A. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to Leishmaniasis control. **Parasites & Vectors**, v.8, n.131, 2015.

BLANCHETTE, J.; RACETTE, N.; FAURE, R.; SIMINOVITCH, K. A.; OLIVIER, M. *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. **European Journal of Immunology**, v.29, n.11, p.3737-3744, 1999.

BORJA-CABRERA, G. P.; CORREIA PONTES, N.N.; DA SILVA, V.O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; SANTOS, W.R.; GOMES, E.M. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-Quil-A saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v.20, p.3277-3284, 2002.

BRASIL. Distribuição dos casos confirmados de leishmaniose visceral de 1980 a 2008. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/portal/arquivos/pdf/CASOS_CONF_2008LV.pdf. Acesso em: 13 de novembro de 2018.

BRASIL. Lei 51.838 de 14 de março de 1963. Normas para o controle da Leishmaniose no Brasil. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 1963, Seção 1, p. 2865.

BRASIL. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília; DF: Ministério da Saúde, 2014, 122 p.

BRAZIL, R. P. B.; RANGEL, E. F. L. Biologia de flebotomíneos neotropicais. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro, Brasil, Editora Fiocruz, 2003, p. 257-270.

BREARLEY, G. Wildlife disease prevalence in human-modified landscapes. **Biological Reviews**, v. 88, p. 427–442, 2012.

CASTILHO, T. M.; SHAW, J. J.; FLOENTER-WINTER, L. M. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.2, p. 540-546, 2003.

CIARAMELLA, P., OLIVA G.; LUNA, R. D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, p. 539–543, 1997.

CUPOLILLO, E.; BOITÉ, M.; PORROZZI, C. R. **Leishmaniose do continente americano**. CONCEIÇÃO-SILVA & ALVES. C. R. Parte I. 1º edição.38-39, 2014.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, v. 2, n.1, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. **Parasitology Research**, v. 106, p. 857-860, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Distribuição espacial da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, p. 411-412, 2005.

DAVIES, C. R.; REITHINGER, R.; CAMPBELL-LENDRUM, D.; FELICIANGELI, D.; BORGES, R.; RODRIGUEZ, N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 4, p. 925–950, 2000.

DE ALMEIDA ADO, B.; SOUSA, V.R.; DA CRUZ, F.A.; DAHROUG, M.A.; FIGUEIREDO, F.B.; MADEIRA M.F. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n.4, p.359-65, 2012.

DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 5, p.1373-1380, 2003.

DI-BLASI, T.; LOBO, A. R.; NASCIMENTO, L. M.; CORDOVA-ROJAS, J. L., PESTANA, K.; MARIN-VILLA, M.; TEMPONE, A. J.; TELLERIA, E. L.; RAMALHO-ORTIGAO, M.; MCMAHON-PRATT, D.; TRAUB-CSEKO, Y. M. The Flagellar Protein FLAG1/SMP1 is a Candidate for *Leishmania* Sand Fly Interaction. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 15, n.3, p.202-209, 2005.

FARIA, A. R., ANDRADE, H. M. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática**. Dissertação (Mestrado

em Parasitologia) – Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2012.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). *Clín. Vet.*, v. 5, p. 36-44, 2005.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**. Canine Leishmaniasis: an update. Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet. p. 6-10, Barcelona, Spain, 1999.

GARCIA, L.; KINDT, A.; BERMUDEZ, H.; LIANOS-CUENTAS, A.; DE DONCKER, S.; AREVALO, J.; WILBER QUISPE TINTAYA, K.; DUJARDIN, J.C. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.2294-2297, 2004.

GIUDICE, E.; PASSANTINO, A. Detection of *Leishmania* amastigotes in peripheral blood from four dogs - short communication. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.59, p. 205-213, 2011.

GOMES, Y. M. A.; CAVALCANTI, M. P.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, v. 175, p. 45–52, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, set. 2004.

GRAÇA, G. C. **Desenvolvimento e avaliação comparativa de metodologias baseadas na PCR para diagnóstico molecular e identificação específica de agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar que circulam em áreas endêmicas brasileiras**. (Dissertação de Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 106 f., 2011.

GRAÇA, G.C.; VOLPINI, A.C.; ROMERO, G.A.; OLIVEIRA NETO, M.P.; HUEB, M.; PORROZZI, R.; BOITÉ, M.C.; CUPOLILLO, E. Development and validation of PCR-

based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 664–74, 2012.

GUIMARÃES, A. M.; ROCHA, C. M. B. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; ROSADO, I. R.; MORAIS, L. G.; SANTOS, R. R. D. Fatores associados a *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18. supl. 1, p. 49-53, 2009.

HARHAY, M.O.; OLLIARIO, P.L.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H.N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n.9, p. 403 – 409, 2011.

HARRUS, S.; BANETH, G. Drivers for the emergence and re-emergence of vectorborne protozoal and bacterial diseases. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 35, n. 11-12, p. 1309-1318, 2006.

HOORFAR, J.; COOK, N.; MALORNY, B.; WAGNER, M.; DE MEDICI, D.; ABDULMAWJOOD, A. Letter to the editor. **Lett Appl Microbiol**, v. 38, n. 2, p. 79-80, 2002.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

KERR, S. F. Palaeartic Origin of *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p.7580, 2000.

KOUTINAS, A. F.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; MYLONAKIS, M. E.; LEONTIDES, L.; POLIZOPOULOU, Z.; BILLINIS, C.; A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**. 98:247-61, 2001.

LACHAUD, L.; MARGCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DREREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 100, p. 811-827, 2005.

LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; DUARTE, S. C.; FERNANDES, P. R.; AMARAL, A. V. C.; SOUZA, M. A. relato de um caso clínico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 1, p. 69-72, 2005.

LINHARES, V. L. V.; SILVA, M. C.; SILVA, A. M.; BEZERRA, D. R. O adestramento positivo como tratamento em cães com distúrbios comportamentais de ansiedade: Relato de casos. **PUBVET**, v.12, n.4, p.1-9, 2018.

Lira, R. A. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: avaliação do desempenho dos kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral- Canina-Bio-Manguinhos**. (Dissertação de Doutorado) - Recife (PE): Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Saúde Coletiva; 2005.

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHÖNIAN, G. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy.

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA., v. 104, n. 22, p. 9375–9380, 2007.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 274-287, 2003.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RADSTROM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, p.39-48, 2003.

MANNA, L. Comparision of different tissue sampling for PCRbased diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.

MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; GOMES, A. A.; SILVA, A. R.; VIEIRA, R. F.; CAMACHO, A. A.; QUINN, J.; CHANDRASHEKAR, R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 175, 2011.

MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, suplemento 1, p. 41-45, 2004.

MISSAWA N. A.; VELOSO M. A.; MACIEL G. B.; MICHALSKY E. M.; DIAS E. S. Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 76-78, 2011.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Metilfosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. **Clinical infectious diseases**, v. 60, n. 9, p. 1398-404, 2015.

MONTEIRO A.G. **Diagnóstico molecular e identificação das espécies de Leishmania na leishmaniose visceral canina no Distrito Federal, Brasil.** (Dissertação de Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 43f., 2014.

MORAIS, I. C. **Sazonalidade na exposição a flebotomíneos em cães e humanos em área endêmica para leishmaniose visceral: um estudo de intervenção.** (Dissertação de Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 56 f., 2016.

MOREIRA, M. A.; Luvizotto, M. C.; Garcia, J. F.; Corbett, C. E.; Laurenti, M. D.: Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p.245-252, 2007.

OLIVEIRA, J. M.; FERNANDES, A. C, DORVAL, M. E. C.; ALVES, T. P.; FERNANDES, T. D.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. L. L.; OLIVEIRA, J. M. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 188-193, 2010.

OLIVEIRA, M. M. **Caracterização molecular e avaliação da infectividade in vitro e in vivo de duas cepas de *Leishmania* spp. isoladas de cães naturalmente infectados.** (Tese de Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

OLIVEIRA, T. M. F. DE S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, p. 7-11, 2008.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 293-305, 2005.

PALATNICK, C. B. S.; SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; BARBOSA A. R.; PALATNICK, M. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 65, p. 510-7, 2001.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. In vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, p. 970-974, 2008.

PORTELLA, M. F. **Diagnóstico diferencial e comparativo através de métodos sorológicos e moleculares da infecção por *Leishmania spp* em cães residentes na região oceânica de Itaipu, município de Niterói, Rio de Janeiro.** (Dissertação de Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, 74f., 2018.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.: Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, p.1915-1934, 2009.

RAMALHO-ORTIGAO, M.; SARAIVA E. M.; TRAUB-CSEKO Y. M. Sand flyinteractions: long relationships are not necessarily easy. **Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 195-204, 2010.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, v. 3, p. 1041-1047, 2002.

SALAM, M. A.; MONDAL, D.; KABIR, M.; EKRAM, A. R.; HAQUE, R. PCR for diagnosis and assessment of cure in kala-azar patients in Bangladesh. **Acta Tropica Journal**, v. 113, p. 52-55, 2010.

SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; UTZET-SADURNI, M.; GIGER, U.; SANCHEZ, A.; FRANCINO, O.: Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, v. 39, n. 36, 2008.

SANTANA, C. C.; VASSALLO J.; DE FREITAS, L. A.; OLIVEIRA, G. G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C. DOS SANTOS, W. L. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v.30, p.515-524, 2008.

SANTOS, F. S.; TÁPARO, C. V.; COLOMBO, G.; TENCATE, L. N.; PERRI, S. H. V.; MARINHO, M. Conscientizar para o bem-estar: posse responsável. **Revista Ciência em Extensão**, v. 10, n. 2, p. 65-73, 2014.

SANTOS, J. M.; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M. R.; LINO, F. R.; ANDRADE, L. S.; SOUZA, R. C. Prevalence of anti-*Leishmania* spp antibodies in dogs from Garanhuns, in the middle scrub zone (Agreste) of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p.41-45, 2010.

SCHÖNIAN, G.; KUHLS, K.; MAURICIO I. L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. v. 138, n. 4, p.405-425, 2011.

SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H.D.; PRESBER, W.; JAFFE, C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p. 349–358, 2003.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control, p. 255-272, 2008.

SILVA, S.M. **Avaliação de um protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulada em lipossomas manométricos, associados ao alopurinol, no tratamento de leishmaniose visceral canina.** (Tese de Doutorado)

– Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 243 f., 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.1-18, 2009.

SUNDAR, S.; OLLIARIO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 3, n. 5, p. 733-40, 2007.

TATIBANA, L. S.; COSTA-VAL, A. P. Relação homem-animal de companhia e o papel do médico veterinário. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas**, v. 1, p. 12-19, 2009.

THALMANN, O.; SHAPIRO, B.; CUI, P.; SCHUENEMANN, V. J.; SAWYER, S. K.; GREENFIELD, D. L.; GERMONPRÉ, M. B.; SABLIN, M. V.; LÓPEZGIRÁLDEZ, F.; DOMINGO-ROURA, X. Complete mitochondrial genomes of ancient canids suggest a European origin of domestic dogs. **Science**, v. 342, p. 871-874, 2013.

ULIÃO, F. S. **Uso de método de biologia molecular quantitativo (PCR Real-Time) na avaliação de reservatórios para leishmaniose visceral**. (Tese de Doutorado) – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Instituto Oswaldo Cruz, Bahia, 84 f, 2011.

VEGA-LÓPEZ F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion Infectious Diseases**. v. 16, n. 2, p. 97-101, 2003.

WEIRATHER, J. L.; JERONIMO, S. M.; GAUTAM, S.; SUNDAR, S.; KANG, M.; KURTZ, M. A.; HAQUE, R.; SCHRIEFER, A.; TALHARI, S.; CARVALHO, E. M.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 3892–3904, 2011.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: Rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 5, p. 851-856, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases.**

In: WHO Technical Report Series, N. 949. ed. Geneva, World Health Organization, p. 201, 2010.

9 ANEXOS

10.1. Anexo 1



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VolP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br, www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 015/17 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 150/16

Projeto Pesquisa: "Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina em Uberlândia, Minas Gerais Brasil".

Pesquisador Responsável: Sydnei Magno da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 14 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU

10.2. Anexo 2

TERMO DE ESCLARECIMENTO E LIVRE CONSENTIMENTO

Senhor proprietário,

A leishmaniose visceral é uma doença grave que acomete homens, mulheres, crianças e o seu melhor amigo, o cão. A doença, se não tratada, pode causar a morte de pessoas. As crianças e os idosos são os que mais adoecem. A doença é passada para as pessoas e para os cachorros pela picada de um inseto, muito pequeno, chamado de "flebótomo" ou "mosquito palha". O cachorro sofre da doença como nós. Ainda não existe uma vacina ou um tratamento que o governo possa distribuir para os cães. Por isto, os cães que apresentam o resultado do exame positivo para a doença são recolhidos pelo serviço público e sacrificados. Esta medida é muito importante, pois um cachorro doente pode passar a doença para o flebótomo que, por sua vez, passa a doença para outro cachorro ou para outras pessoas. A leishmaniose visceral no cão pode ser agravada se o seu animal estiver com outras doenças, como a erliquiose e a babesiose também conhecidas como "doença do carrapato". Tendo em vista a importância dessas doenças para a saúde dos homens e dos cães, o Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia está realizando uma pesquisa em parceria com o Hospital Veterinário da UFU, com o objetivo saber o número de cães com leishmaniose visceral e as "doenças do carrapato", aqui em Uberlândia. Gostaríamos de convidá-lo a participar dessa pesquisa. Você contribuirá respondendo a algumas perguntas e autorizando o exame clínico e coleta de amostras de sangue e/ou aspirado de medula óssea/linfático do seu cão, para que possamos descartar ou confirmar a doença no seu animal. Você será informado e orientado de acordo com os resultados dos exames laboratoriais que iremos realizar nestas amostras. Ninguém poderá obrigá-lo a participar desse estudo, mas contamos com sua compreensão e colaboração, uma vez que essas informações serão muito importantes para auxiliar no entendimento e controle da doença na nossa cidade, inclusive no seu bairro. Em nenhum momento seu nome e endereço serão divulgados. Você poderá fazer quantas perguntas achar necessário, que responderemos com o maior prazer. É importante ressaltar que o senhor(a) tem a total liberdade de se recusar a participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento. Se estiver de acordo em participar e contribuir com nossa pesquisa assinie ou marque com sua digital no espaço abaixo. Desde já agradecemos sua participação.

DECLARAÇÃO

"Declaro estar de acordo que o meu animal seja submetido à avaliação clínica e laboratorial por médico veterinário, e que se preencher os requisitos necessários, seja incluído nesta pesquisa. Autorizo que seja conduzido os procedimentos propostos pelos projetos de pesquisa. Autorizo ainda, que os resultados desta pesquisa possam ser utilizados para elaboração de publicações científicas. "

Nome completo: _____

Assinatura

Uberlândia, ____/____/____