



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS – CSHNB
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



LARISSA LUCENA DA SILVA

**COMPARAÇÃO DO TESTE RÁPIDO COM A TÉCNICA DE PCR PARA
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE
PICOS, PIAUÍ**

PICOS - PI
2018

LARISSA LUCENA DA SILVA

**COMPARAÇÃO DO TESTE RÁPIDO COM A TÉCNICA DE PCR PARA
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE
PICOS, PIAUÍ**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito para obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Landim Pacheco

PICOS – PI
2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca José Albano de Macêdo

S586c Silva, Larissa Lucena da
Comparação do teste rápido com a técnica de pcr para diagnóstico de Leishmaniose visceral canina no município de Picos, Piauí / Larissa Lucena da Silva.– 2018.
CD-ROM : il.; 4 ¾ pol. (55 f.)
Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí, Picos, 2018.
Orientador (A): Profa. Dra. Ana Carolina Landim

1. Leishmaniose Visceral Canina. 2. Diagnóstico Molecular,
3. Teste Rápido Imunocromatográfico DPPI. Título.

CDD 616.936 4

LARISSA LUCENA DA SILVA

**COMPARAÇÃO DO TESTE RÁPIDO COM A TÉCNICA DE PCR PARA
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE
PICOS, PIAUÍ**

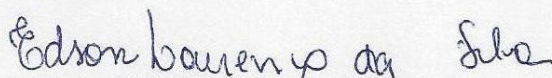
Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito para obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Monografia aprovada em 29/06/2018

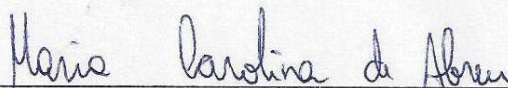
BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Landim Pacheco
Curso de Ciências Biológicas - UFPI/CSHNB



Primeiro Examinador: Prof. Dr. Edson Lourenço Silva
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – IFPI



Segunda Examinadora: Profa. Dra. Maria Carolina de Abreu
Curso de Ciências Biológicas - UFPI/CSHNB

Aos meus pais, João Deus e Maria Neusa, exemplos de vida; a minha irmã Laiane, mas que uma irmã, minha segunda mãe, e ao meu esposo e companheiro Gilson Fernando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, criador do universo pela inspiração e motivação.

Aos meus pais Maria Neusa e João Deus, a minha irmã Maria Laiane e meu esposo Gilson Fernando, pelo apoio, incentivo, nos momentos mais difíceis sempre acreditando no meu potencial. Amo vocês.

Agradeço a minha orientadora, Dr. Ana Carolina Landim Pacheco pelos ensinamentos, paciência, confiança e principalmente por me proporcionar o fascinante ingresso na Biologia Molecular, no qual pude adquirir aprendizado e enriquecimento pessoal e profissional.

Ao professor Dr. Edson Lourenço da Silva, por disponibilizar um pouco do seu tempo para me ajudar e me auxiliar durante todos os meus experimentos moleculares.

A Universidade Federal do Piauí-CSHNB pelo meu ingresso no curso de Ciências Biológicas e a todos os professores do meu curso, que contribuíram para minha formação acadêmica.

As minhas colegas e amigas de coleta que conheci na Universidade, Carolina Rocha, Débora Cristina e Jussara Damascena, obrigado por me ajudarem no desenvolvimento do meu trabalho, pelo carinho, amizade e apoio.

As minhas colegas e amigas de curso, Kuenia Consoelo, Kele Feitosa e Jaciara Silva pela amizade, carinho e principalmente pelas boas risadas juntas.

Agradeço também a toda a equipe do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Picos pela parceria, apoio e incentivo na realização do meu trabalho.

A toda a equipe LAPEDONE, que contribuiu de forma significativa para a realização do meu trabalho, mais que um grupo, uma família que sempre esteve disponível sempre que precisei, obrigado a todos.

A todos citados ou não agradeço por fazerem parte dessa etapa da minha vida, minha tão sonhada formação acadêmica.

“A persistência é o caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina é uma antroponose crônica e sistêmica causada por protozoários do gênero *Leishmania*. É transmitida pela picada de insetos vetores denominados flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, sendo o cão doméstico considerado o principal reservatório, possuindo inicialmente um caráter rural que vem se expandindo para as áreas urbanas. O objetivo desse trabalho foi realizar a comparação da eficácia de dois métodos diagnósticos para a doença, sendo um sorológico, o teste rápido imunocromatográfico TRI DPP®, que é utilizado como teste de triagem no Centro de Controle de Zoonoses de Picos-Piauí, e o outro é o molecular, a PCR que se trata de um diagnóstico que vem sendo bastante utilizado devido sua alta sensibilidade e especificidade. Foram coletadas 117 amostras de fragmentos de baço, fígado e linfonodo de 40 cães diagnosticados positivos e eutanasiados. Em laboratório as amostras passaram por extração de DNA e logo em seguida por PCR. Todos os cães analisados pela PCR foram confirmados positivos para a doença, porém apresentando variações quanto a positividade nas amostras coletadas pois nem todos os tecidos apresentaram resultado positivo. Dos 40 cães analisados 11 cães apresentaram resultados positivos em todos os tecidos, 9 cães apresentaram resultados positivos em 2 tecidos e 20 cães apresentaram resultados positivos em apenas 1 tecido. O grau de parasitismo ou falhas durante o processamento da amostra nos tecidos analisados pode ser uma possível causa para a divergência de resultados. A concordância de resultados entre o teste rápido TRI e o teste molecular de PCR confirma que ambos possuem uma eficácia boa no diagnóstico da LVC, porém devido as limitações da PCR que produzem resultados variáveis, se torna necessário a realização de outras técnicas de diagnóstico para a obtenção de resultados mais precisos.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral Canina, Diagnóstico Molecular, Teste Rápido Imunocromatográfico DPP®.

ABSTRACT

Visceral Canine Leishmaniasis is a chronic and systemic anthroponosis caused by protozoa of the genus *Leishmania*. It is transmitted by the bite of insects vectors called phlebotomines of the genus *Lutzomyia*, being the domestic dog considered the main reservoir, initially possessing a rural character that has been expanding to the urban areas. The objective of this study was to compare the efficacy of two diagnostic methods for the disease, a serological test being the rapid immunochromatographic test TRI DPP®, which is used as a screening test at the Zoonoses Control Center of Picos-Piauí. another is the molecular PCR which is a diagnosis that has been widely used because of its high sensitivity specificity. A total of 117 samples of spleen, liver and lymph node fragments were collected from 40 dogs diagnosed as positive and euthanized. In the laboratory the samples were extracted by DNA and soon afterwards by PCR. All dogs analyzed by PCR were confirmed positive for the disease, however showing variations in positivity in the samples collected because not all the tissues presented positive results. Of the 40 dogs analyzed, 11 dogs presented positive results in all tissues, 9 dogs presented positive results in 2 tissues and 20 dogs presented positive results in only 1 tissue. The degree of parasitism or failures during sample processing in the tissues analyzed may be a possible cause for the divergence of results. The concordance of results between the rapid TRI test and the molecular PCR assay confirms that both have good efficacy in the diagnosis of LVC, but because of the limitations of PCR that produce variable results, it is necessary to perform other diagnostic techniques for the diagnosis. more precise results.

Keywords: Visceral Canine Leishmaniasis, Molecular Diagnosis, Rapid Immunochromatographic Test DPP®.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa de Distribuição Mundial do Status da Endemicidade da LV em 2015	20
Figura 2 – Tipos de Formas dos Parasitas <i>Leishmania</i> durante seu ciclo vital. A: Forma Promastigota; B: Forma Amastigota	23
Figura 3 – Localização do cinetoplasto dos parasitas <i>Leishmania</i> nas duas formas em que se encontram durante seu ciclo vital. A: Cinetoplasto da Forma Amastigota; B: Cinetoplasto da Forma Promastigota.....	23
Figura 4 – Fêmea de Flebotomíneo	25
Figura 5 – Ciclo Biológico da Leishmaniose Visceral	27
Figura 6 – Componentes do Alere Leishmaniose Ac Test Kit	30
Figura 7 – Dispositivo de Teste utilizado no CCZ de Picos	30
Figura 8 – Coleta de Sangue para realização do teste rápido.....	31
Figura 9 – Procedimento de Realização do Teste Rápido	31
Figura 10 – Dispositivo de Teste Rápido demonstrando os resultados obtidos no diagnóstico de Leishmaniose. A: Resultado Negativo; B: Resultado Positivo; C: Resultado Inválido.....	32
Figura 11 – Diagrama Esquemático da Organização do Minicirculo de <i>Leishmania</i>	33
Figura 12 – Município de Picos, Piauí	35
Figura 13 – Equipamentos Utilizados na Extração do DNA dos Tecidos. A: Banho Maria; B: Centrífuga; C: Tanque de Eletroforese em Gel MultiSUB Midi	38
Figura 14 – Equipamentos Utilizados na PCR dos tecidos. A: Termociclador Modelo MJ MiniCycler PTC-150; B: Transiluminador LED 470 NM Kasvi	40
Figura 15 – Gel de Agarose da PCR	43

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Principais Espécies de *Leishmania* causadoras da LV..... 21

Tabela 1 – Resultados de Positividade e Negatividade analisados pela técnica de PCR em três diferentes fragmentos de tecidos 42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

CCZ - Centro de Controle de Zoonoses

DPP® - Dual Path Platform

ELISA - Imunoensaio Enzimático

LV - Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

SFM - Sistema Fagocítico Mononuclear

TRI -Teste Rápido Imunocromatográfico

µl - Microlitro

µm - Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Leishmaniose Visceral.....	17
3.2 Epidemiologia.....	19
3.3 Agente etiológico.....	21
3.4 Reservatório	24
3.5 Vetor.....	24
3.6 Ciclo Biológico.....	26
3.6.1 Ciclo biológico no vetor	26
3.6.2 Ciclo Biológico no Cão e no Homem	26
3.7 Diagnóstico.....	28
3.7.1 Diagnóstico Parasitológico	28
3.7.2 Diagnóstico Sorológico.....	29
3.7.3 Diagnóstico Molecular	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Local de Estudo.....	35
4.2 Área de Coleta	36
4.3 Procedimento de Coleta	36
4.4 Procedimentos em Laboratório	37
4.4.1 Extração de DNA.....	37
4.4.2 Processo de Extração	37
4.4.3 Reação de PCR	39
5 RESULTADOS	41

5.1 Resultados do Teste Rápido	41
5.2 Resultados do Teste de PCR	41
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma antropozoonose crônica e sistêmica causada por protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), sendo transmitida pela picada de insetos vetores denominados flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia longipalpis* (França, 1924) que infectam animais e seres humanos (OLIVEIRA, 2011; WHO, 2016).

Segundo Costa (2011), no ciclo urbano de transmissão, os cães são considerados os principais reservatórios do protozoário *Leishmania*, através do qual, o homem pode se infectar. Porém, animais silvestres, como lobos, coiotes e raposas, também podem funcionar como reservatórios.

A LVC também é conhecida como calazar, possuindo inicialmente um caráter rural, porém a doença vem se expandindo para as áreas urbanas (BRASIL, 2014).

Na última década a LVC tem aumentado sua ocorrência e vem se alastrando pelos estados brasileiros. Entre as principais causas desse aumento estão o desmatamento, condições sanitárias precárias, transporte de animais que estão infectados de uma área para outra, entre outras (STEINDEL et al., 2013).

Os agentes causadores das leishmanioses são os protozoários da divisão Kinetoplastea (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae) e gênero *Leishmania* Ross, 1903 (REY, 2008). Possuem uma forma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra sem flagelo aparente chamada de amastigota, nos tecidos dos vertebrados (BRASIL, 2014).

O diagnóstico da doença é baseado na combinação dos sinais clínicos com algum teste laboratorial (MARTINS-MELO et al, 2014). Entre os testes disponíveis para diagnóstico da LVC, estão os testes parasitológicos diretos, sorológicos (Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)) e (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)), moleculares (Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)) e o teste rápido imunocromatográfico (TRI) (FARIA, 2014).

Apesar dos vários tipos de diagnósticos existentes e seus aparentes progressos, realizar o diagnóstico 100% eficaz da LVC ainda é um grande desafio (FARIA, 2014). Pois os testes disponíveis ainda não apresentam 100% de sensibilidade e especificidade, isso ocorre devido ao fato de haver sintomas e sinais clínicos que não são específicos, e que podem ser confundidas com outras enfermidades, como a Doença de Chagas, Esquistossomose, entre outras

(GONTIJO; MELO, 2004). No Brasil, para o diagnóstico da LVC, o Ministério da Saúde recomenda: triagem com teste TRI e confirmação pelo ELISA (MARCELINO; FILHO, 2015).

O teste TRI (Teste Rápido Imunocromatográfico) se trata de um teste simples e de fácil utilização, que revela o resultado em minutos. Já o teste ELISA (Ensaio Imunoenzimático) é altamente sensível fazendo a verificação da existência de anticorpos específicos contra *leishmania* (FREITAS, 2010; MARQUES, 2008).

Levando em consideração a grande variedade de diagnósticos existentes para a LVC e considerando que a PCR vem sendo bastante utilizada devido sua alta sensibilidade e especificidade, esse trabalho buscou realizar a técnica de PCR com o objetivo de testar sua eficiência no diagnóstico da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a comparação dos resultados obtidos entre o método molecular de PCR e o Teste Rápido (TRI) no diagnóstico de LVC em cães com suspeita da doença, no município de Picos, Piauí.

2.2 Objetivos Específicos

- Acompanhar a realização do teste TRI nos cães com suspeita de LVC que chegam ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Picos;
- Realizar o teste de PCR nas amostras de tecidos de cães que ao confirmarem a infecção por leishmaniose foram eutanasiados no CCZ;
- Comparar os resultados do teste rápido com o teste de PCR.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leishmaniose visceral

As leishmanioses fazem parte de um grupo de antropozoonoses de caráter parasitário, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, possuindo ciclo de vida heterogênico, ou seja, vivem em hospedeiros vertebrados e insetos vetores alternadamente (MORAIS 2015).

Segundo HENN 2016, as leishmanioses se apresentam em duas formas clínicas principais: a leishmaniose tegumentar, que acomete a pele e mucosas, sendo que essas lesões cutâneas são expansivas e persistentes, e a leishmaniose visceral (LV), que se caracteriza como a forma mais grave podendo ocasionar óbito, acometendo os órgãos viscerais como o fígado, baço e medula óssea.

Na LV, os órgãos internos são os mais acometidos pelos protozoários *Leishmania*, devido serem ricos em macrófagos, grandes células fagocitárias do sistema imunológico, que são os principais alvos dos parasitas. Ao contaminar os macrófagos, os parasitas *Leishmania* utilizam sua energia para se reproduzir, além de utilizá-los também como alojamento. Os protozoários *Leishmania* são inicialmente liberados na epiderme do hospedeiro sendo fagocitados pelos macrófagos, ao estarem repletos de parasitas os macrófagos tornam-se desvitalizados e rompem-se liberando os parasitas, ocorrendo assim a disseminação dos parasitas para os órgãos internos ricos em macrófagos onde irão continuar a se reproduzir, como o baço, linfonodo, fígado, medula óssea, entre outros (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007).

A LV apresenta desde formas clínicas discretas até formas clínicas gravíssimas, que quando não tratada, leva ao óbito em até 75% a 95% dos casos e até mesmo quando tratada pode apresentar uma letalidade de 10% a 20% (READY, 2014; ALVAR et al., 2012). A primeira descrição da LV ocorreu na Grécia, no ano de 1835. Na Índia, em 1869 a LV era denominada de “Kala-jwar” (febre negra) ou “Kala-azar” (Calazar) devido ao escurecimento da pele durante a doença (MICHALICK; GENARO, 2005).

No Brasil, a primeira ocorrência registrada da doença foi em 1913 no Paraguai, através de uma análise de uma necropsia de um paciente oriundo de Boa Esperança (Mato Grosso). Logo após, por meio de um estudo de diagnóstico e

distribuição da febre amarela no Brasil, foram encontrados 41 casos positivos de LV oriundos de lâminas de pessoas das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2014).

No Piauí a doença é conhecida desde 1934, sendo considerado um estado que apresenta um dos principais focos no Brasil. Em 1980 no Piauí observou-se uma vasta epidemia, configurando-se como a primeira epidemia de leishmaniose visceral no Brasil, com concentração principalmente na área urbana de Teresina, capital do estado (COSTA, 1990).

A LV é uma enfermidade que apresenta atualmente uma incidência crescente nos centros urbanos, devido ao convívio muito próximo do ser humano com o cão (principal reservatório) em domicílios e ruas estando, portanto, exposto ao vetor nos diferentes ambientes de circulação (GALVÃO, 2016).

Além disso, os cães apresentam uma parasitemia na pele superior à encontrada no ser humano, favorecendo a infecção dos vetores. Outro fator agravante é a alta taxa reprodutiva desses animais associado a falta de responsabilidade da maioria dos tutores que abandonam seus cães, além da grande adaptação dos cães ao vetor, contribuindo para uma maior circulação do mesmo, o que facilita uma epidemia da enfermidade (SCHIMMING; PINTO-SILVA, 2012; OPAS, 2012).

Os cães infectados podem apresentar três condições clínicas, que são os cães assintomáticos (sem sinal clínico), cães oligossintomáticos (com no máximo três sinais clínicos) e cães sintomáticos (mais de três sinais clínicos presentes) (CALADO, 2014). Em geral, a sintomatologia canina corresponde a uma inicial alteração do estado orgânico do animal, com progressiva perda de peso, acompanhada de apatia e em casos extremos anorexia e febre (KOUTINAS, 2014). Ainda segundo o mesmo autor, outros sintomas ocorrem como caquexia, lesões dérmicas, atrofia do músculo temporal, esplenomegalia, lesões oculares, onicogribose, vômito/diarreia, entre outros.

No Brasil, o controle da LV é realizado através do uso de inseticidas com o propósito de combater os vetores, além da realização de diversos diagnósticos e o tratamento precoce para a população, bem como o controle da população canina, que é realizado através de eutanásia para aqueles cães que forem diagnosticados como positivos para LV (FARIA, 2014).

3.2 Epidemiologia

A LV tem sido considerada uma das doenças tropicais mais negligenciadas no mundo segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), devido à falta de medidas mais eficazes de controle da doença e também à falta de investimentos no desenvolvimento de novos fármacos que possam combater a enfermidade (ESCOPO-PCDT, 2016). Acomete principalmente a população mais vulnerável no ponto de vista econômico e social e que tem maiores dificuldades de acesso ao serviço de saúde (MORAIS, 2015).

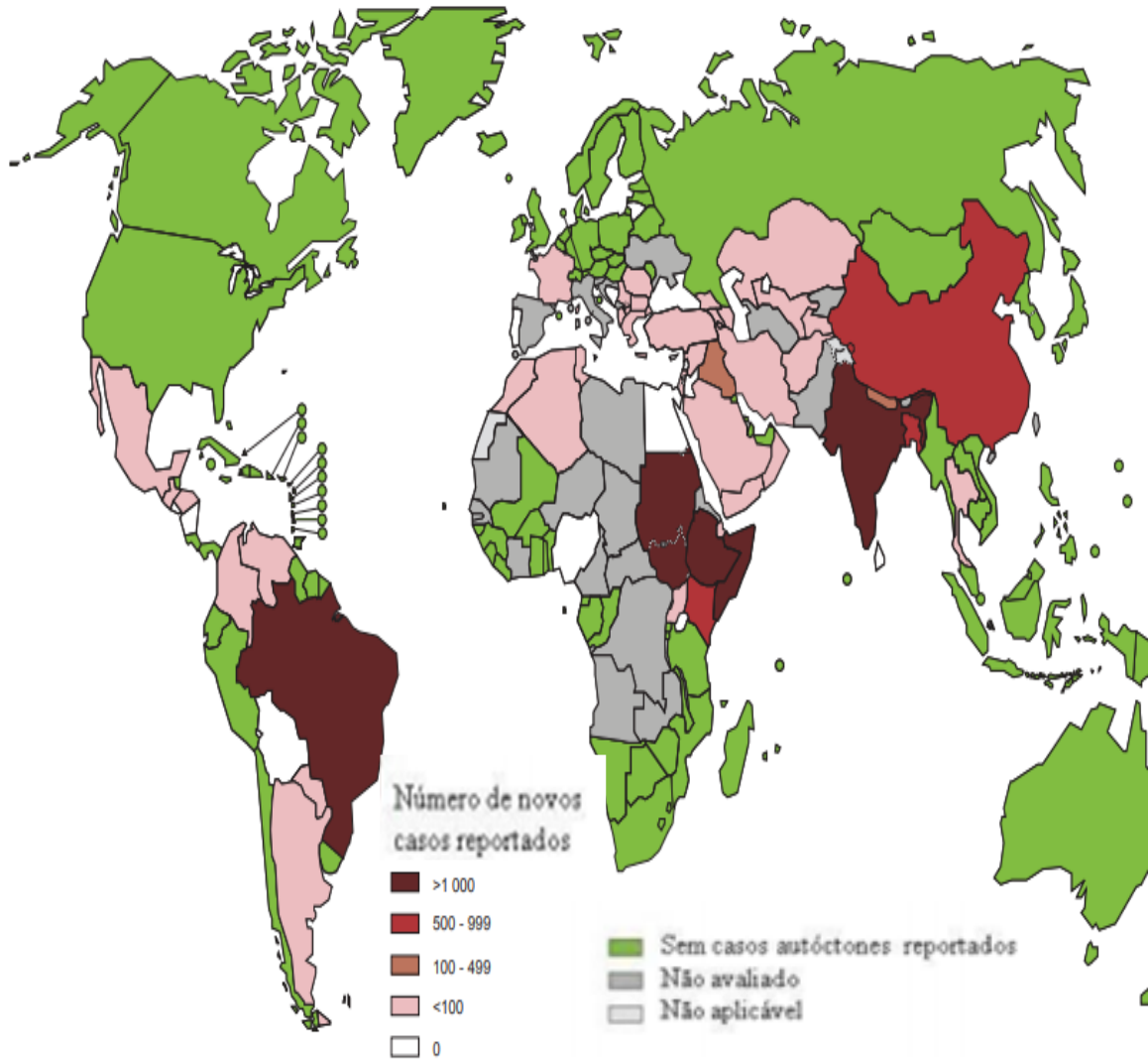
O crescente processo de urbanização desordenado, com migrações de áreas rurais para centros urbanos, associado ao desmatamento e as secas, tem resultado na expansão das áreas endêmicas e no aparecimento de novos surtos (BRASIL 2014).

De acordo com a OMS (2016), a doença afeta principalmente pessoas pobres na África, Ásia e América Latina, estando associado à desnutrição, ao deslocamento da população, moradias precárias, sistema imunológico fraco e falta de recursos. Estima-se que mais de 98 países e territórios são endêmicos para a leishmaniose, onde cerca de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos de LV ocorrem anualmente em todo o mundo, sendo que mais de 90% dos casos globais de LV ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão.

Um fator alarmante é que, dos casos registrados na América Latina, 96% têm ocorrência no Brasil, com média de 3.500 casos registrados anualmente apresentando coeficiente de incidência de 2,0 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2014).

As epidemias recorrentes de leishmaniose visceral na África Oriental (Etiópia, Quênia, Sudão do Sul e Sudão) causaram elevada morbidade e mortalidade nas comunidades afetadas. Em 2014, mais de 90% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão; países como Bangladesh que relatou mais de 9 mil casos em 2006, registraram em 2014 a 2015 cerca de 600 novos casos (Figura 1) (OMS, 2016).

Figura 1 – Mapa de distribuição mundial do status da endemicidade da LV em 2015.



Fonte: ADAPTADO DE OMS (2015)

3.3 Agente etiológico

O parasito *Leishmania* pertence à divisão Kinetoplastea (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae) e gênero *Leishmania*; é constituído por organismos unicelulares dimórficos que apresentam ciclo de vida heterogênico. Ao redor do mundo são conhecidas mais de 30 espécies de *Leishmania*, sendo mais de 20 patogênicas ao homem (Quadro 1) (MORAIS, 2015; HENN, 2016).

Quadro 1- Principais espécies de *Leishmania* causadoras da LV.

Espécies do Velho Mundo	Espécies do Novo Mundo
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Leishmania infantum</i> (Nicolle, 1908) • <i>Leishmania donovani</i> (Laveran & Mesnil, 1903) • <i>Leishmania tropica</i> (Wright, 1903) • <i>Leishmania aethiopica</i> (Bray, Ashford & Bray, 1973) • <i>Leishmania major</i> (Yakimoff & Schokhor, 1914) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Leishmania chagasi</i> (Cunha & Chagas, 1937) • <i>Leishmania mexicana</i> (Biagi, 1953); inclui <i>pifanoi</i> (Medina & Romero, 1959) • <i>Leishmania amazonensis</i> (Lainson & Shaw, 1972); inclui <i>gamhami</i> (Scorza et al., 1979) • <i>Leishmania venezuelensis</i> (Bonfante-Garrido, 1980) • <i>Leishmania brasiliensis</i> (Vianna, 1911) • <i>Leishmania panamensis</i> (Lainson & Shaw, 1972) • <i>Leishmania peruviana</i> (Velez, 1913) • <i>Leishmania guyanensis</i> (Floch, 1954) • <i>Leishmania lainsoni</i> (Silveira, Shaw, Braga & Ishikawa, 1987) • <i>Leishmania naiff</i> (Lainson & Shaw, 1989) • <i>Leishmania shawi</i> (Lainson, Braga & de Souza, 1989)

Fonte: Marques, 2008

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros de acordo com as diferenças de desenvolvimento do parasito nos insetos vetores: subgênero *Viannia*, que abrange o complexo “*Leishmania Braziliensis*” e subgênero *Leishmania*, que abrange os complexos “*Leishmania Mexicana*” e “*Leishmania Donovanii*”, este último complexo inclui as espécies *Leishmania (Leishmania) donovani* (Laveran & Mesnil, 1903) na Ásia e África; *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908) na Ásia,

Europa e África; e *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) nas Américas, as três espécies que causam a LV (REY, 2008).

As espécies citadas acima possuem cadeias epidemiológicas específicas, apresentando também diferenças quanto a expressão clínica da doença; na África (*L. donovani*) a doença afeta principalmente jovens e adultos; já as espécies *L. infantum* e *L. chagasi* (Ásia, Europa e Américas) afetam principalmente crianças entre 5 e 10 anos de idade (BASTOS, 2012).

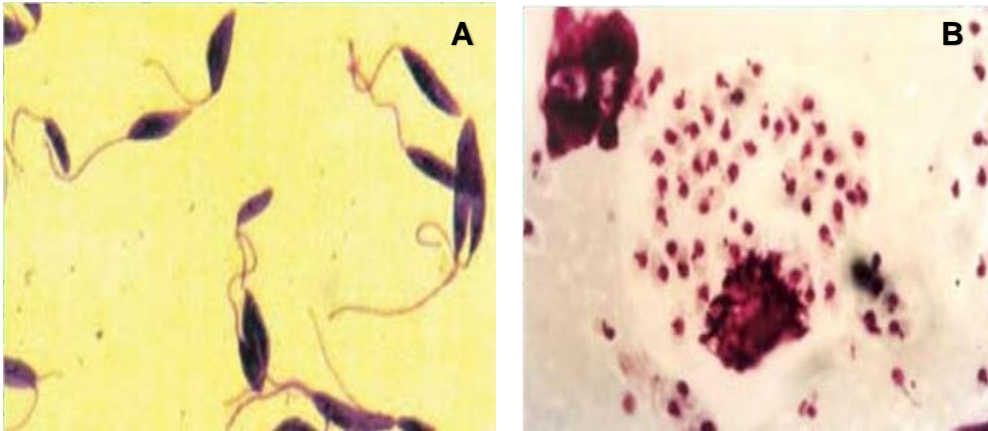
Os parasitos desse gênero caracterizam-se por apresentar duas formas durante seu ciclo vital: forma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor flebotomíneo (*Lutzomyia longipalpis*, Lutz & Neiva, 1912), e a forma aflagelada ou amastigota, encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (BRASIL, 2014).

As promastigotas apresentam corpo alongado, medindo entre 14 e 20 μm , além de um flagelo livre; as amastigotas apresentam corpo ovóide, medindo entre 2,1 e 3,2 μm (Figura 2) (MAIA, 2013).

Esses parasitas possuem uma estrutura denominada de cinetoplasto (extensão da mitocôndria), essa estrutura é rica em DNA mitocondrial, o kDNA. Na forma amastigota, o cinetoplasto se encontra junto ao núcleo, já na forma promastigota o cinetoplasto se encontra na extremidade do flagelo (Figura 3) (BRASIL, 2014).

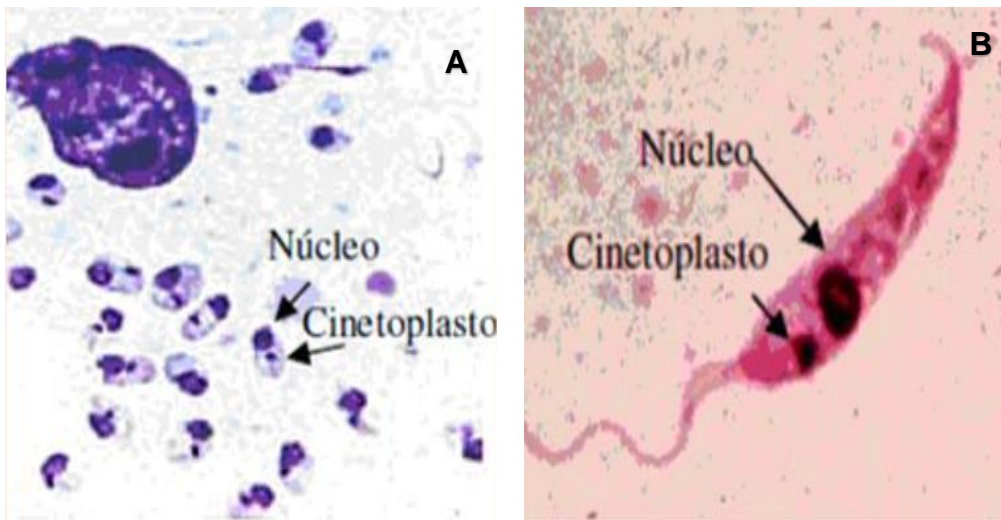
O parasito *Leishmania* geralmente parasita as células do sistema fagocítico mononuclear dos seus hospedeiros, com tendência de concentração nos tecidos e órgãos em que abundam os macrófagos (ALVAR et al, 2008).

Figura 2 – Tipos de formas dos parasitas *Leishmania* durante seu ciclo vital. A: Forma Promastigota; B: Forma Amastigota.



Fonte: Brasil, 2014

Figura 3 – Localização do cinetoplasto dos parasitas *Leishmania* nas duas formas em que se encontram durante seu ciclo vital. A: Cinetoplasto da Forma Amastigota; B: Cinetoplasto da Forma Promastigota.



Fonte: Brasil, 2014

3.4 Reservatório

O cão é considerado o principal reservatório doméstico da LV na área urbana, tendo grande importância no ciclo de transmissão para os humanos por abrigarem uma grande quantidade de amastigotas na derme e também por poderem permanecer assintomáticos por longos períodos de tempo, mesmo estando com infecção ativa (DANTAS-TORRES, 2007).

No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas e marsupiais (BRASIL, 2014). O fato de esses animais possuírem hábitos sinantrópicos é tido como o motivo que poderia promover a ligação entre os ciclos silvestres e domésticos (MARZOCHI; CARVALHO, 1994).

Outros animais como roedores, felinos e equídeos também podem se infectar, porém o cão se torna o reservatório mais importante, pois possui alta prevalência de infecção, chegando até 40% da população em algumas áreas, o que o torna uma fonte muito vasta para o vetor (BRASIL, 2010).

No ciclo de transmissão, tanto os cães sintomáticos como os assintomáticos infectados são importantes fontes de infecção para o vetor, representando importante papel na transmissão da doença (MOHAMMADIHA et al., 2012).

3.5 Vetor

Os vetores da LV são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae e Gênero *Lutzomyia* (França, 1924), conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros e que fazem seu ciclo larval na matéria orgânica úmida, e não na água, o que dificulta o seu controle. No Brasil, a espécie *Lutzomyia longipalpis* é considerada a principal espécie transmissora da LV (BRASIL, 2010; CRESPO et al, 2012).

As fêmeas dos flebotomíneos é que participam do processo de transmissão dos protozoários para os reservatórios, por meio do hábito hematófago que realizam como processo fundamental para maturação de seus ovos; os ovos são postos em locais úmidos no solo associados a matéria orgânica (FREITAS et al., 2010).

Os flebotomíneos são insetos dípteros, de pequeno porte, corpo piloso, delgado e diferem-se dos demais dípteros por, principalmente, desenvolverem todo seu estágio larval em matéria orgânica contida no solo e não em água. Possuem um par de asas e um par de pequenas estruturas, chamados de halteres ou balancins, que são responsáveis pela estabilidade do voo e zumbido característico dos dípteros, como mostra a figura seis (Figura 4) (BASTOS, 2012; CRESPO et al, 2012).

Figura 4 - Fêmea de Flebotomíneo



Fonte: Bastos, 2012

Os flebotomíneos vivem em locais com muita umidade e são vistos geralmente nas horas sem luminosidade e pouca movimentação de ar. Devido ao seu pequeno tamanho podem ser encontrados em ocos de árvore, galinheiros, currais, entre outros; e sua atividade se dá em geral ao entardecer e durante a noite (CRESPO et al, 2012). Eles são considerados de grande importância na sanidade animal e na saúde pública, por transmitirem os protozoários *Leishmania* para animais e humanos, tanto no ambiente urbano quanto rural (DANTAS-TORRES, 2009).

Os flebotomíneos atualmente estão em uma elevada expansão e adaptação aos ambientes urbanos, vivendo próximos a vegetação, troncos de árvores, além de locais que apresentam matéria orgânica geradas por falta de condições sanitárias e também por animais domésticos (BRASIL, 2014). Uma das consequências que pode

estar associada a urbanização dos flebotomíneos é o êxodo rural, que provoca destruição ambiental e ocupação desenfreada da população levando a condições precárias de vida (COSTA et al., 2007).

3.6 Ciclo Biológico

Segundo Gomes et. al. (1995), o ciclo biológico de *Leishmania* é do tipo heterogênico, pois envolve a fêmea de *Lutzomyia longipalpis* como transmissora, e os vertebrados que vão funcionar como hospedeiros e reservatórios no ciclo.

3.6.1 Ciclo Biológico no vetor

A fêmea se contamina ao ingerir formas amastigotas do protozoário *Leishmania* na pele do hospedeiro contaminado, enquanto realiza repasto sanguíneo (MARQUES, 2008). No tubo digestivo do mosquito, essas formas amastigotas se diferenciam em promastigotas, com um flagelo externo (GONÇALVES et al., 2013).

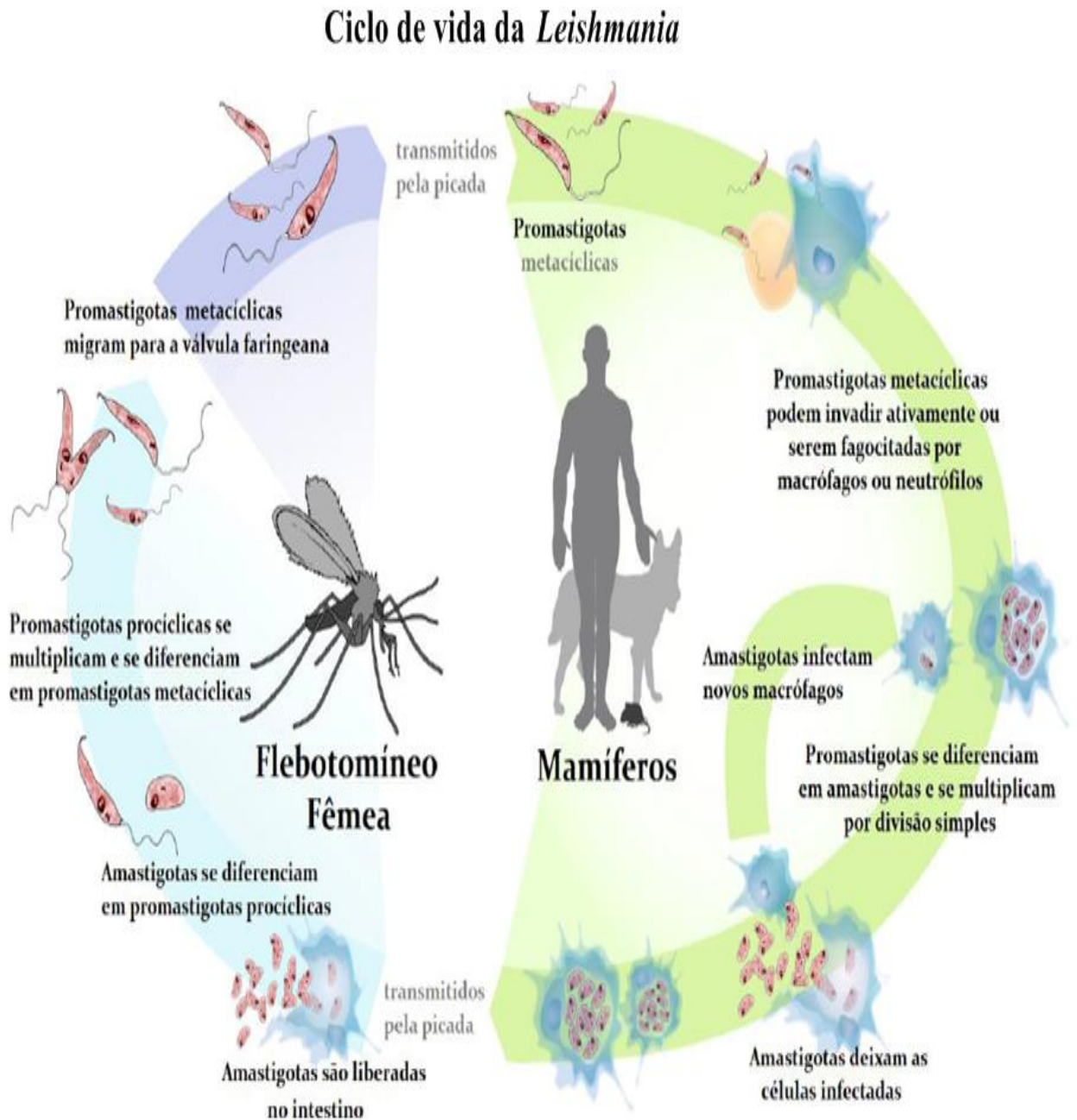
Essas formas promastigotas se multiplicam por divisão binária e transformam-se em paramastigotas, as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo até se diferenciarem em formas infectantes (promastigotas metacíclicas) (Figura 7) (KILLICK-KENDRICK, 2002).

3.6.2 Ciclo Biológico no cão e no homem (principais hospedeiros vertebrados)

Quando o inseto vetor exerce novo hematofagismo, as formas promastigotas metacíclicas infectantes são transferidas novamente para o hospedeiro vertebrado, sendo fagocitadas pelos macrófagos do mesmo (MARQUES, 2008).

Dentro dos macrófagos do hospedeiro vertebrado os promastigotas (forma infectante para o hospedeiro vertebrado) perdem o flagelo e tornam-se formas amastigotas novamente (Rosypal et al., 2003). Essas formas amastigotas se multiplicam continuamente até destruírem a célula, sendo liberadas na corrente sanguínea. São, então, fagocitadas novamente e, desta maneira, são carreadas até os linfonodos, baço e medula óssea, levando a infecção da pele para outros órgãos internos (Figura 5) (GONÇALVES et al., 2013).

Figura 5 - Ciclo biológico da Leishmaniose Visceral



Fonte: Canal Ciência, 2015

3.7 Diagnóstico

O diagnóstico da LVC ainda é considerado um grande desafio, pois apesar de existirem vários exames disponíveis, nenhum deles apresenta 100% de sensibilidade e especificidade, além disso, os cães podem apresentar uma grande variedade de sinais clínicos inespecíficos, o que dificulta ainda mais o diagnóstico (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; BRASIL, 2014).

Durante a realização do diagnóstico, alguns aspectos devem ser levados em consideração, como o quadro clínico do cão (assintomático, oligossintomático, sintomático), os dados epidemiológicos da região, o histórico do animal, além da combinação de dois ou mais testes para uma precisa confirmação da suspeita de infecção, evitando a leitura errada de testes falso-positivos e falso-negativos (ROCHA, 2012; IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007).

Entre os métodos de diagnóstico disponíveis estão o clínico, epidemiológico e os laboratoriais que abrangem os testes parasitológicos, sorológicos (RIFI, ELISA, TRI) e molecular (PCR) (SINGH; SUNDAR, 2015).

No Brasil, para o diagnóstico de LVC, o Ministério da Saúde recomenda, por meio da nota técnica nº1/2011 (NOTA TÉCNICA CONJUNTA nº 01/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS), a realização do TRI como teste de triagem e o teste ELISA (sorológico) como teste confirmatório.

3.7.1 Diagnóstico Parasitológico

O teste parasitológico consiste na visualização direta do parasita em esfregaço ou cultura de tecido esplênico, do linfonodo ou da medula óssea (OLIVEIRA et al., 2011). A especificidade desse método é de 100%, porém a sensibilidade depende de alguns fatores, como o grau de parasitismo, do tipo de material biológico coletado, do processamento e coloração, além do observador (BARBOSA et al., 2012)

Testes que utilizam cultura de células são muito pouco utilizados na prática, pois a cultura possui custo bastante elevado, necessita de um laboratório especializado e dedicado, além da demora em fornecer o resultado (SINGH; SUNDAR, 2015).

3.7.2 Diagnóstico Sorológico

De acordo com o Ministério da Saúde, o primeiro teste a ser realizado em um cão com suspeita de Leishmaniose, é o TRI DPP® (Dual Path Platform, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) (HIRSCHMANN, 2013).

O teste rápido DPP® oferece o resultado em cerca de 15 minutos, dispensando estrutura laboratorial e equipamentos, o que facilita o seu uso no campo. Além disso, possui uma tecnologia de alta sensibilidade, agregando precisão ao diagnóstico da LVC em sangue, soro ou plasma; por se tratar de um teste de triagem, permite que apenas os casos positivos sejam levados para confirmação da infecção (READY, 2014)

Esse teste faz a detecção qualitativa de anticorpos *anti Leishmania*, através da proteína recombinante rK28 (antígenos rK9, rK39 e rK26) em amostras de soro, plasma ou sangue total canino, com resultados qualitativos (positivo ou negativo) para o diagnóstico animal (MARCELINO; FILHO, 2015).

Ainda segundo o mesmo autor, além do TRI apresentar o resultado em 15 minutos aproximadamente e necessitar apenas de uma gota de sangue, soro ou plasma, também se caracteriza por ser pouquíssimo invasivo (MARCELINO; FILHO, 2015).

Atualmente, a produção de testes TRI DPP® não tem conseguido atender a demanda nacional de diagnóstico, sendo necessárias também outras alternativas diagnósticas que possam manter as atividades de controle e vigilância da doença (HIRSCHMANN, 2013).

Para serem utilizados, os kits TRI DPP® devem ter registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no mercado que estão sendo comercializados, com este registro o TRI de plataforma única, que é produzido pela empresa Alere™, possuindo similaridades com o TRI DPP®, se tratando de uma nova opção no diagnóstico de LVC (MARCELINO; FILHO, 2015).

O kit Alere™ Leishmaniose fornece os seguintes componentes: (Figura 6):

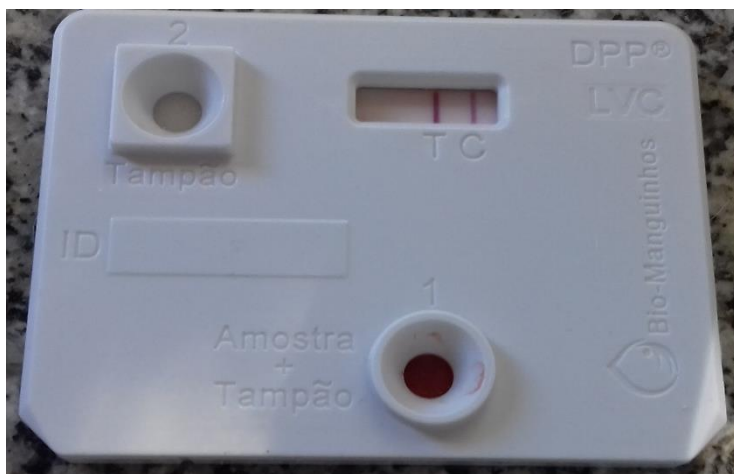
- 1) 5 ou 10 cartões de resultados;
- 2) 5 ou 10 tubos de amostra descartáveis com EDTA;
- 3) 1 frasco com solução tampão de teste;
- 4) 5 ou 10 dispositivos de teste;
- 5) 5 ou 10 tubos capilares de 10 microlitros (uL).

Figura 6 - Componentes do Alere Leishmaniose Ac Test Kit



Fonte: MARCELINO; FILHO, 2015

Figura 7 - Dispositivo de Teste utilizado no CCZ de Picos



Fonte: Autoria Própria (2018)

Durante a realização do teste rápido, a primeira etapa é o procedimento de coleta e preparação da amostra, que ocorre inicialmente com a imobilização do animal com o propósito de se evitar acidentes. Em coletas de campo podem ser utilizadas lancetas para a obtenção de sangue capilar a partir da orelha, patas ou rabo do animal, em seguida é recolhido 10µl de sangue (MARCELINO; FIHO, 2015) (Figura 8).

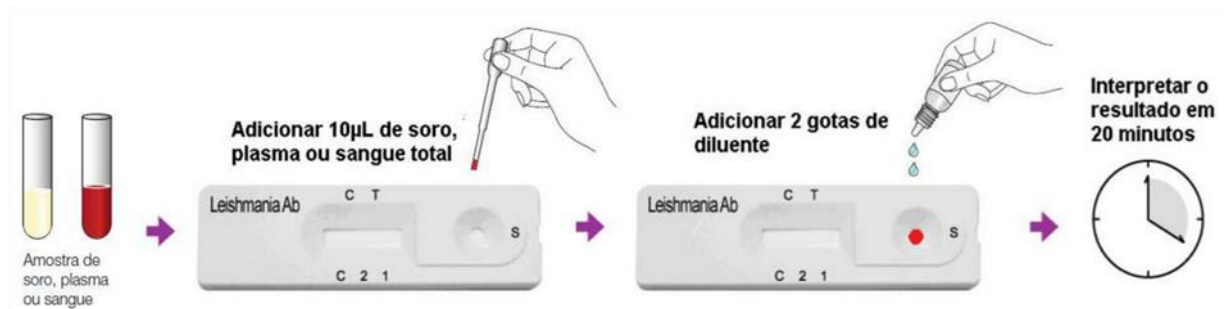
Figura 8 - Coleta de sangue para realização do teste rápido



Fonte: MARCELINO; FILHO (2015)

O sangue coletado deve ser colocado imediatamente na plataforma de teste, com o propósito de evitar a formação de pequenos coágulos que podem interferir no desempenho do teste (Figura 9) (MARCELINO; FILHO, 2015).

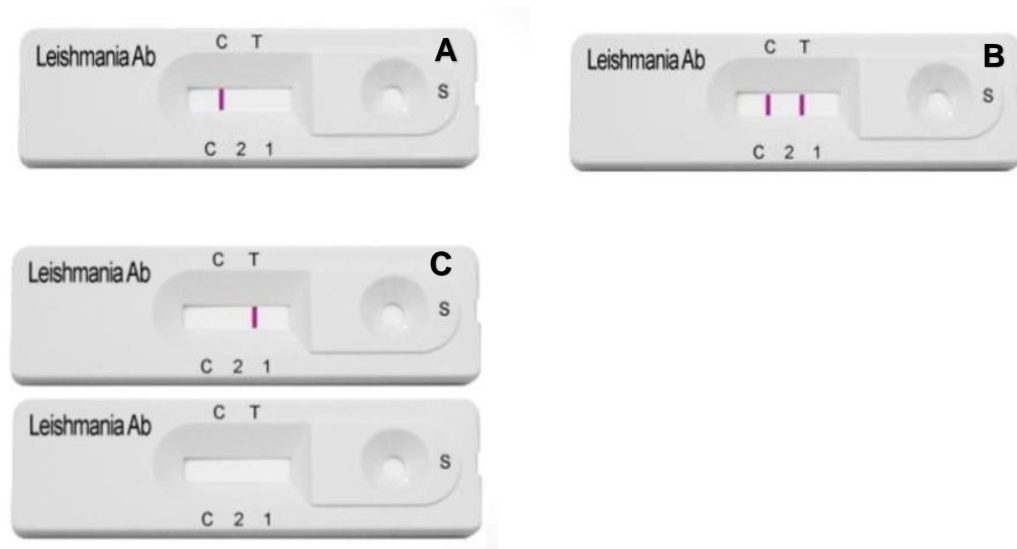
Figura 9- Procedimento de realização do teste rápido



Fonte: MARCELINO; FILHO (2015)

O teste Alere™ possui em seu dispositivo de teste uma letra T que indica linha teste e uma letra C que indica linha controle. A linha C (linha de controle) sempre deve aparecer quando o procedimento do teste estiver correto e os reagentes estiverem funcionando; se houver a presença de anticorpos *anti Leishmania*, uma linha roxa será visível na linha T. O resultado do teste será negativo se houver somente a presença de uma linha na janela C; o resultado será positivo se houver a presença de duas linhas, uma na janela C e a outra na janela T; quando o resultado for inválido, aparecerá apenas uma linha na janela T ou então não aparecerá nenhuma linha nas janelas (Figura 10) (BIO-MANGUINHOS, 2011).

Figura 10 – Dispositivo de Teste Rápido demonstrando os resultados obtidos no diagnóstico de Leishmaniose. A: Resultado Negativo; B: Resultado Positivo; C: Resultado Inválido.



Fonte: MARCELINO; FILHO (2015)

Entre os métodos sorológicos ainda existem a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), este último (ELISA) se combina com o teste rápido no diagnóstico sorológico recomendado pelo Ministério da Saúde no Brasil; o RIFI e o ELISA são bastante utilizados nos inquéritos epidemiológicos (BRASIL, 2006). O propósito desses dois era realizar a verificação da existência de anticorpos (IgG) específicos contra *Leishmania* no soro sanguíneo do animal (MARQUES, 2008).

A RIFI é um teste rápido e de baixo custo, a sua sensibilidade varia de 68% a 100%, já a especificidade varia de 74% a 100%. O ELISA se trata de um dos testes mais utilizados no diagnóstico laboratorial, com elevada sensibilidade que varia de 71% a 100%, a especificidade varia de 85% a 100% (MORAIS, 2013). Ambos possuem a vantagem de demandar menos tempo que o teste parasitológico direto de cultura, porém ainda demandam tempo e pessoal treinado (TÁVORA et al., 2007).

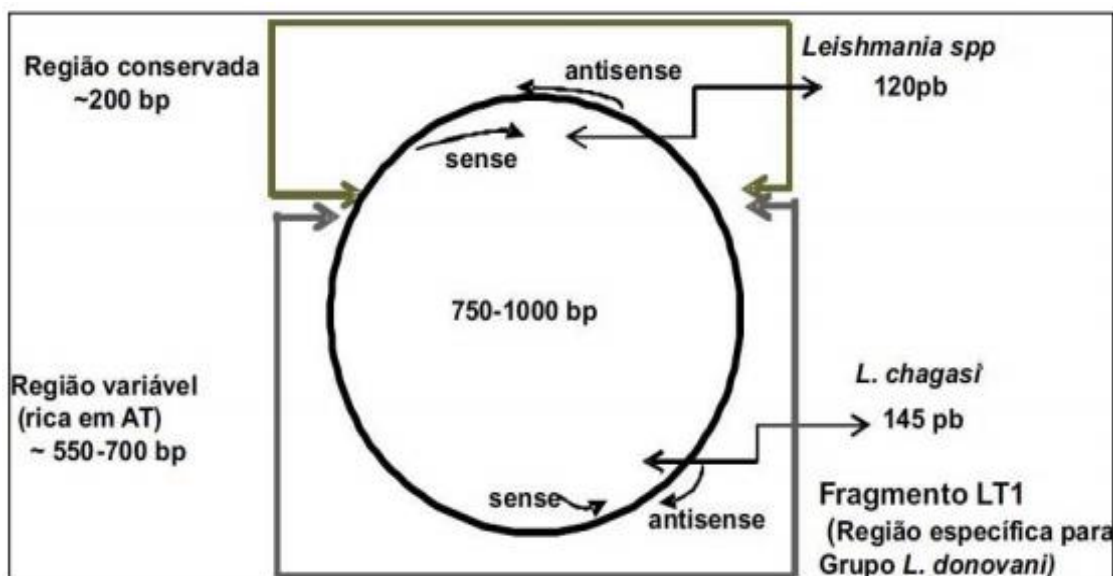
3.7.3 Diagnóstico Molecular

Os estudos e pesquisas moleculares baseados na detecção e identificação minuciosa dos parasitas do gênero *Leishmania* vem sendo desenvolvidos desde a década de 80 (GONTIJO; MELO, 2004). A hibridização do DNA foi a primeira técnica molecular desenvolvida para o diagnóstico, atualmente o diagnóstico molecular tem como principal alvo o DNA presente nos minicírculos do kDNA da região conservada da amostra ou à amplificação do minicírculo completo (HIRSCHMANN, 2013).

A região dos minicírculos é composta por moléculas menores apresentando cerca de 10.000 unidades de kinetoplasto, além de sequências heterogêneas entre os grupos de *Leishmania*. Cada minicírculo é composto de uma molécula de DNA circular, apresentando uma região conservada que contém aproximadamente 200pb com três blocos de sequências conservadas em todas as espécies de *Leishmania*; o restante da molécula apresenta sequências altamente variáveis, que contém um grande número de nucleotídeos adenina e timina (NOYES, et al., 1998; FERNANDES et al., 1996; FU; KOLESNIKOV, 1994).

Os minicírculos de *Leishmania* são considerados ótimas sondas moleculares, pois estão presentes no kinetoplasto em grande número apresentando uma região conservada de aproximadamente 200-120pb evidenciada em cada molécula (Figura 11) (ROGERS; WIRTH, 1987).

Figura 11 – Diagrama esquemático da Organização do Minicírculo de *Leishmania*



Fonte: Costa (2014)

A PCR se trata de um teste que imita, *in vitro*, o processo de replicação do DNA realizado *in vivo* pelos organismos na natureza; nesse processo há a possibilidade de realizar a síntese de milhões de cópias de uma única sequência de DNA em poucas horas (CUPOLILLO, 2005).

A eficácia do teste de PCR depende de diversos fatores como os *primers* utilizados, o número de parasitos existentes na amostra, o método de extração do DNA, além do protocolo de PCR seguido (HENN, 2016).

Nos estudos de LV, a PCR vem sendo bastante utilizada em diferentes aspectos além do diagnóstico como no monitoramento do tratamento, estudos epidemiológicos, entre outros (SINGH; SUNDAR, 2015). Apesar de se tratar de um método sensível na detecção do parasito *Leishmania* em uma grande variedade de materiais clínicos de humanos e cães, a PCR é mais utilizada em estudos epidemiológicos do que em diagnósticos de rotina, pois para o uso em larga escala, a técnica de PCR necessita de ajustes para se tornar uma técnica mais simples e de custo operacional mais baixo (GONTIJO; MELO, 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local de estudo

O presente trabalho teve sua pesquisa realizada no município de Picos, na região centro Sul do Piauí, com uma distância de 320 km da capital Teresina. Possui uma área de 677,304 Km² com uma população de aproximadamente 76.749 mil habitantes, latitude de 7° 04' 36" S; longitude de 41° 28' 00" O e altitude de 203m (IBGE, 2016).

O município conta com um total de 27 bairros na zona urbana e 28 localidades que se encontram na zona rural (MBI, 2017). Com um clima tropical, semiárido quente e seco, e com duas estações bem definidas (seca e chuvosa), possui limites com os municípios de Santana do Piauí e Sussuapara ao norte, ao sul com Itainópolis, a oeste com Dom Expedito Lopes e Paquetá, e a leste com Sussuapara e Geminiano (Figura 12) (AGUIAR; GOMES, 2004).

Figura 12 - Município de Picos, Piauí



Fonte: Google imagens

4.2 Área de coleta

A coleta foi realizada CCZ (Centro de Controle de Zoonoses) do município de Picos, que fica localizado na Rua Projetada, bairro Parque de Exposição, nº 3. O CCZ é responsável por recolher cães e gatos abandonados pelas ruas da cidade, realizar serviços de doação, eutanásia e sepultamento de animais, além de prevenir e controlar as zoonoses (como raiva, calazar, dengue e doença de Chagas), desenvolvendo sistemas de vigilância sanitária, vigilância epidemiológica e vigilância ambiental em saúde.

4.3 Procedimento de coleta

O presente estudo foi realizado com amostras biológicas (baço, fígado, linfonodo) de 40 cães, onde 22 eram fêmeas e 18 eram machos, sem raça definida e com idades variadas. As coletas ocorreram entre o período de maio de 2016 a abril de 2017, na cidade de Picos/PI no CCZ do município de Picos.

A identificação de animais com sintomas, coleta dos animais, realização do teste rápido TRI, diagnóstico inicial de LVC e eutanásia são procedimentos que foram realizados no CCZ sob a responsabilidade do médico veterinário responsável pelo CCZ - Picos-PI. O procedimento de necropsia para retirada dos órgãos dos animais foi realizado pela Profa. Dra. Ana Carolina Landim Pacheco, Médica Veterinária (CRMV-PI 01309-VP).

Os tecidos escolhidos para a realização da pesquisa foram órgãos internos, o baço, fígado e linfonodo, devido esses tecidos apresentarem maior parasitismo de *Leishmania* por serem ricos em macrófagos, que são grandes células fagocitárias do sistema imunológico, considerados os principais alvos dos parasitas *Leishmania*.

Dos 40 cães, foram retirados fragmentos de baço, fígado e linfonodo, totalizando 40 amostras de baço e fígado. Entretanto, devido a condições adversas durante o procedimento de coleta dos órgãos, só foi possível obter 37 amostras de linfonodos. O total de amostras somando baço, fígado e linfonodo foi de 117 amostras.

As amostras de tecidos foram armazenadas em potes plásticos, todos identificados e numerados e em seguida levados para a Universidade Federal de Picos-CSHNB para serem congelados no laboratório próprio.

4.4 Procedimentos em laboratório

4.4.1 Extração de DNA

Todos os procedimentos de laboratório foram realizados no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI). As 117 amostras dos 40 cães tiveram seu DNA extraído pelo método modificado a partir do descrito por Milligan (1998).

4.4.2 Processo de Extração

De cada amostra foi retirada uma pequena quantidade de tecido e logo após os tecidos foram colocados separados em tubos eppendorf. Foram adicionados aos tubos 400 uL de uma solução de extração que continha 416 uL de NaCl/5m, 520 uL de Tris HCl/1m, 20,8 uL de EDTA/500m/a, 4.243,20 uL de H₂O. Em seguida foi adicionado 80 uL de SDS/20%A e 16 uL de Proteinase K (20 mg/ml). Tudo foi misturado bem no vortex e levado ao banho maria por três horas a 55,56°C até que o tecido se dissolvesse bem (Figura 13).

Após o BM, foram adicionados 300 uL de NaCl/5m nos tubos contendo os tecidos dissolvidos, agitando bem logo em seguida e transportados para a centrífuga/1000°rpm durante 10 minutos (Figura 13). Após a centrifugação, o sobrenadante formado foi cuidadosamente retirado e transferido para novos tubos eppendorf.

A esse sobrenadante já depositado em novos tubos foi adicionado 300 uL de etanol gelado (P.A), misturado no vortex e levados para a geladeira a 20°C por 1 hora. Após 1 hora, os tubos com o DNA foram retirados da geladeira e foram levados novamente para a centrífuga/1000°rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o pellet formado foi lavado com 300 uL de etanol 70%, sendo direcionados a centrífuga/1000°rpm novamente por 10 minutos.

Depois de centrifugados, foi descartado o sobrenadante dos tubos eppendorf e colocados para secar. Após secarem completamente, foi adicionado aos tubos 200 uL de tampão de diluição e as amostras de DNA extraído foram estocadas na geladeira até o processo de PCR.

Antes de serem levados para a reação de PCR, os DNAs extraídos e armazenados dentro dos tubos eppendorf estocados na geladeira foram direcionados para o processo de eletroforese em gel de agarose 1% a 80 V por 30 minutos, com o objetivo de visualizar os resultados das extrações. O corante utilizado para corar o DNA foi o SYBR Safe, no Tanque de eletroforese em gel MultiSUB Midi (Figura 13).

Figura 13 – Equipamentos utilizados na extração do DNA dos tecidos. A: Banho Maria; B: Centrífuga; C: Tanque de eletroforese em gel MultiSUB Midi.



Fonte: Autoria Própria (2018)

4.4.3 Reação de PCR

A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) conforme Quinnell et al. (2001), ocorreu entre o período de 02/11/17 a 30/04/18. Na PCR foram amplificados fragmentos de aproximadamente 805 pb do minicírculo do cinetoplasto do grupo *L. donovani* (SMYTH et al. 1992; SCRIMGEOUR et al. 1998).

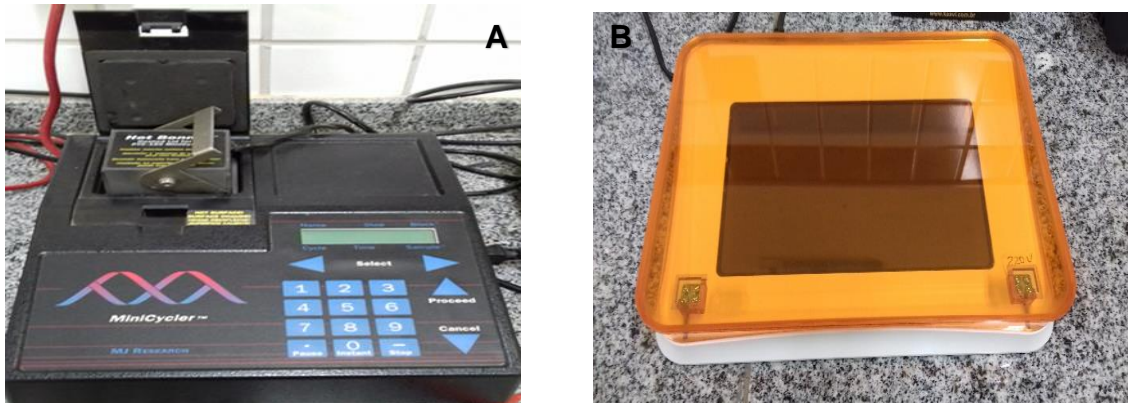
Para a realização da PCR foi feito inicialmente um mix que continha 3,25 uL de dNTP, 4,81 uL de MgCl₂, 127, 01 uL de água Milli-Q, 3,25 uL de cada primer AJS31 (50-GGG GTT GGT GTA AAA TAG GGCC-30) e DBY (50-CCA GTT TCC CGC CCC GGA G30) (QUINNELL et al. 2000) (Invitrogen®) e 16,25 uL de tampão PCR.

Foi adicionado em cada tubo 12,14 uL do mix, logo após adicionou-se 0,2 uL de Taq Platinum (Invitrogen®) e 0,25 de DNA genômico. Após a adição de todos os componentes, os tubos contendo a reação de PCR foram levados para o aparelho termociclador modelo MJ MiniCycler PTC-150 (Figura 14). Como controle negativo foi realizado uma reação de PCR sem DNA para a verificação de contaminação ou mau funcionamento do *primer*.

A reação compreende um ciclo inicial de desnaturação a uma temperatura de 96°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de a uma temperatura de 95°C (30 seg), 67°C (1min) e 72°C (1min), com extensão final de 72°C por 10 min.

Após o término da reação de PCR, os tubos contendo a PCR foram levados para a eletroforese em gel de agarose 1% por 30 minutos a 60 V, contendo SYBR Safe e como banda de controle padrão 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®). O resultado foi visualizado em aparelho transiluminador LED 470 NM Kasvi, em que foi possível observar a qualidade das amplificações obtidas além da confirmação dos resultados do teste TRI pela PCR (Figura 14).

Figura 14 – Equipamentos utilizados na PCR dos tecidos. A: Termociclador modelo MJ MiniCycler PTC-150; B: Transiluminador LED 470 NM Kasvi.



Fonte: Autoria Própria (2018)

5 RESULTADOS

5.1 Resultados do Teste rápido imunocromatográfico (DPP®)

Os testes TRI realizados nos 40 cães desse estudo mostraram-se positivos para a Leishmaniose Visceral Canina.

5.2 Resultados do Teste PCR

No resultado da PCR todos os 40 cães analisados foram confirmados positivos para a doença, porém apresentando variações de resultados, onde 11 cães apresentaram resultados positivos em todos os tecidos; 9 cães apresentaram resultados positivos em 2 tecidos e 20 cães apresentaram resultados positivos em apenas 1 tecido. Dos 117 fragmentos de tecidos referentes aos 40 cães utilizados nesse estudo, 69 fragmentos obtiveram resultado positivo e 48 fragmentos obtiveram resultado negativo. Onde o fragmento de tecido que obteve maior positividade foi o linfonodo (25/37); e o fragmento de tecido que obteve maior negatividade foi o fígado (20/40). Os animais 30, 34 e 35 não tiveram o linfonodo analisado devido não ter sido possível fazer a coleta (TABELA 1).

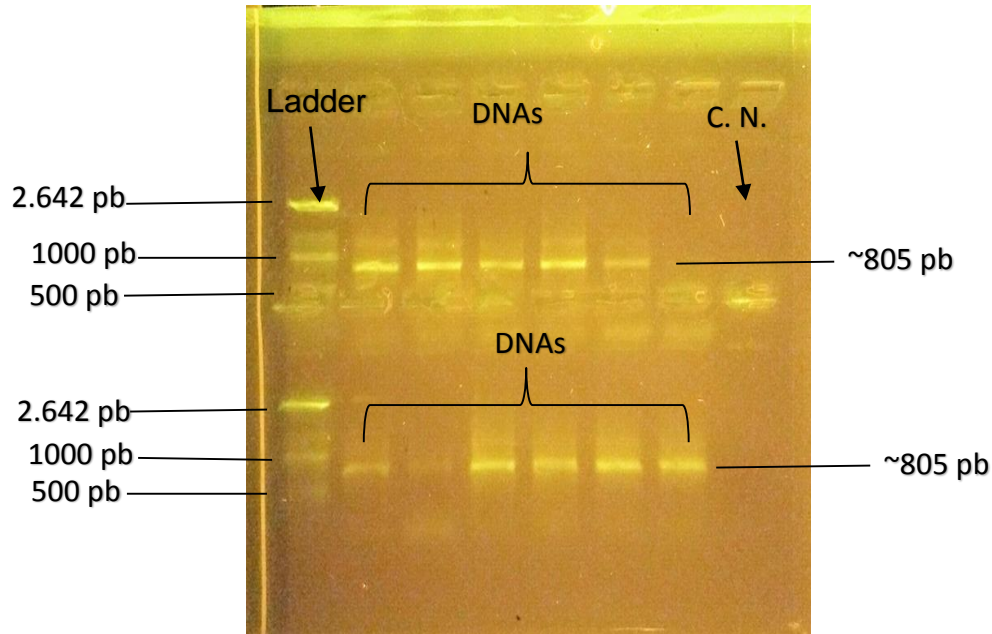
Tabela 1 - Resultados de positividade e negatividade analisados pela técnica de PCR em três diferentes fragmentos de tecidos.

TECIDOS	CÃES																																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
BAÇO	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
FÍGADO	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
LINFONODO	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+		+	+	+		+	+	+	-	-	

Fonte: Dados da pesquisa

A técnica de PCR gerou um fragmento de aproximadamente 805pb, que foi visualizado no aparelho transiluminador após a realização de uma corrida de eletroforese em gel de agarose. O resultado do controle negativo confirmou que não houve contaminação nas amostras de DNA (Figura 15).

Figura 15 - Gel de agarose da PCR.



Fonte: Aatoria própria (2018)

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi realizado com amostras biológicas de cães que obtiveram resultado positivo para a LVC através do teste rápido TRI DPP®. Queiroz (2011) afirma que uma das vantagens que o teste TRI possui é sua alta especificidade, evitando resultados falso positivos. Sousa e colaboradores (2014) observaram em seu estudo que o teste TRI obteve uma especificidade de 98%. Júnior (2014) também analisou o teste rápido TRI em seu estudo, observando que o mesmo obteve um bom desempenho, apresentando especificidade de 90,59%.

Apesar de se apresentar como uma técnica bastante utilizada devido sua alta sensibilidade e especificidade, a PCR apresenta limitações que causam variações em seus resultados, como foi observado no presente estudo a ocorrência de variação nos resultados obtidos. Ramos (2012) explica que a eficácia da PCR depende de vários fatores como, o grau de parasitismo nos tecidos, os *primers* utilizados, além do método de extração aplicado. Yang e Rothman (2004) acrescentam que na técnica de PCR pode haver problemas de contaminação nas amostras gerando resultados falso-positivos, o que foi comprovado nesse trabalho através do controle negativo que não houve contaminação de amostras.

O estudo obteve uma grande positividade de resultados, assim como também uma considerável negatividade de resultados. Maia e colaboradores (2009) sugerem uma explicação para as diferenças de resultados obtidos pela PCR afirmando que, a carga parasitária nos tecidos, assim como a distribuição heterogênea dos parasitos nos tecidos e a resposta imune local são os principais motivos pelos quais a PCR gere resultados diferentes. Quinzel e Courtenay (2009) confirmam que a carga parasitária encontrada nos animais, influencia diretamente na sensibilidade da técnica de PCR; o que pode ser a explicação para os diferentes resultados obtidos nesse estudo.

Santis e colaboradores (2013) ressaltam em seu estudo que o teste rápido TRI se revela como um bom preditor de infecção para a LVC. Por outro lado, Quaresma (2007) explica que o teste molecular PCR também tem se demonstrado como uma promissora opção de teste diagnóstico para a LVC, devido sua alta sensibilidade para detecção do parasito *Leishmania* em cães. O presente trabalho teve como objetivo realizar o teste molecular em amostras de cães já diagnosticados positivos para LVC através do teste rápido TRI, e com isso comparar a concordância

de resultados. Em seu trabalho, Costa (2014) também comparou em Campinas/SP utilizando amostras de cães os resultados obtidos pelo teste rápido TRI com os resultados obtidos pelo teste molecular de PCR, obtendo no teste molecular valores preditivos positivos de 100%, especificidade de 100% e sensibilidade de 88,24% comparados com o teste TRI.

A escolha dos tipos de amostras biológicas a serem analisadas influencia diretamente nos resultados obtidos. Nesse estudo foram utilizados fragmentos de órgãos internos, como baço, fígado e linfonodo, devido esses tecidos serem ricos em células do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM). Lima e colaboradores (2004) explicam que as células do SFM ricas em macrófagos são o principal alvo do protozoário *Leishmania*. Seguindo essa linha de raciocínio, Reis (2013) e Guerra (2016) também utilizaram fragmentos de baço, fígado e linfonodo, além de outras amostras biológicas em seus estudos.

Entre os três fragmentos de tecidos analisados nesse estudo pela PCR, o fragmento de tecido que apresentou maior positividade foi o linfonodo, coincidindo com a afirmação de Ramos (2012) que em seu estudo observou que, entre as diversas amostras biológicas analisadas pela PCR, o linfonodo apresentou-se como melhor opção. Carvalho (2007) também obteve os mesmos resultados, onde de 5 tecidos analisados (linfonodo, baço, pele, medula óssea e sangue) em 27 cães, o linfonodo foi o tecido que apresentou a porcentagem máxima de positividade para o parasitismo da doença. Os seguintes achados corroboram com os achados de Silva (2009) que, entre três amostras biológicas (baço, linfonodo e pele) analisadas pela PCR, a que apresentou maior positividade foi a pele; e com os achados de Valente (2014), que analisando medula óssea e linfonodo, a amostra biológica que obteve maior sensibilidade foi a medula óssea.

No presente estudo o fragmento de tecido que obteve maior negatividade de resultados foi o fígado. Esse resultado coincide com os achados de Penha (2011) que, analisando baço e fígado de cães, demonstrou que o baço apresenta maior carga parasitária que o fígado; e com os achados de Moreira (2013) que também encontrou carga parasitária superior no baço em relação ao fígado. Reis e colaboradores (2009) afirmam que essas respostas diferentes encontradas nos tecidos são geradas devido ao fato de existirem órgãos mais resistentes e órgãos mais propícios a multiplicação do parasito *Leishmania*.

7 CONCLUSÃO

A concordância de resultados entre o teste rápido TRI e o teste molecular confirma que ambos possuem uma eficácia boa no diagnóstico da LVC, apesar das limitações do teste de PCR que induzem a resultados variáveis, como observado no presente trabalho, sendo necessária a utilização de outras técnicas de diagnóstico para obtenção de resultados mais precisos.

Mesmo com a grande variedade de métodos diagnósticos disponíveis no mercado para LVC, ainda não se dispõe de um método 100% sensível, simultaneamente específico e de fácil execução. Portanto, tendo em vista a gravidade da doença e principalmente a importância do cão como principal reservatório no ciclo de transmissão da infecção para as pessoas, a busca por métodos diagnósticos mais simples, eficazes, acessíveis e rápidos é de extrema necessidade para melhorar e acelerar o diagnóstico e com isso diminuir o foco de transmissão da doença.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, R.B.; GOMES, J. R. C. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea, estado do Piauí. Fortaleza: CPRM. n. 8, p. 1, 2004.

ALVAR, J. et al. **The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years.** Clinical Microbiology Reviews, v. 21, n. 2, p. 334-359, abr. 2008.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J. **Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence.** PLoS ONE, v. 7,n.5, p. 35671, 2012.

BARBOSA, V. T. SILVA, M. A. G. SOUSA, M. G. GERING, A. P. SANTOS, H. D. LAUS, J. L. **Detecção de formas amastigotas em exame parasitológico de esfregaço obtido a partir de suabe conjuntival de cães com leishmaniose visceral.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v.64, n.6, p.1465-1470, 2012.

BASTOS, T. S. A. **Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral.** Goiânia, 2012.

BIO-MANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina. **Teste Rápido qualitativo para detecção de anticorpos de cão para Leishmania.** BIO-MANGUINHOS, Rio de Janeiro, 2011.

BRASIL. **Secretaria de Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral.** 1. ed. Brasília: editora MS, 2006.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** 1. ed. Brasília, 2014.

_____. Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Brasília-DF: 2º edição, 1º reimpressão, 2010.

CALADO, A. M. C. **Detecção de marcadores de resistência a múltiplas drogas na pele de cães com infecção natural por Leishmania (Leishmania) infantum chagasi (CUNHA E CHAGAS, 1937) SHAW, 2002, submetidos a diferentes protocolos de tratamentos.** 2014. 77 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP.

CARVALHO, C. C. de. **Determinação da carga parasitária por PCR semiquantitativa em diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania chagasi)* e sua associação com sinais clínicos da doença.** 2007. 70 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, São Luís, 2007.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. **Epidemia de Leishmaniose Visceral no Estado do PI, Brasil, 1980-1986.** Rev. Saúde Pública vol.24 no.5 São Paulo Oct. 1990.

_____. **Canine leishmaniosis in South America.** Parasites & Vectors. 2009; 2(1): 8p.

COSTA, C. H. N.; TAPETY, C.M.; WERNECK, G.L. **Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.40, n.4, p.:415-419, 2007.

COSTA, C.H.N. **How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.44, n.2, p.232-242, 2011.

COSTA, L. N. G. da. **Aplicação da Técnica de PCR para o Diagnóstico e Monitoramento da Leishmaniose Tegumentar e Visceral na Região de Campinas- SP e de Teresina- PI.** 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, na área de Saúde da Criança e do Adolescente) – Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, 2014.

CRESPO, G. C. et al. **Manejo Ambiental para Controle de Leishmaniose Visceral Americana (LVA).** Estado de São Paulo 2012.

CUPOLILLO, E. **Avanços dos estudos moleculares de *Leishmania (Leishmania) chagasi* aplicados ao diagnóstico de LV no Brasil.** OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. Informe final. Brasília, Brasil, 2005. Disponível em: bvs.panaftosa.org.br/textoc/LEANES_Inf_final_leish_2005.pdf. Acesso em: 27 de maio de 2018.

DANTAS-TORRES, F. **The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*.** Veterinary Parasitology, Amsterdam, v.149, p.139-146, 2007.

DE SANTIS, Bianca et al. **Desempenho do teste rápido imunocromatográfico (TRI) para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina: comparação com**

outros métodos sorológicos em cães suspeitos de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, Brasil, v. 50, n. 3, p. 198-205, June 2013. ISSN 1678-4456. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/64591>>. Acesso em: 19 June 2018. doi:<http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v50i3p198-205>.

ESCOPO-PCDT. **Leishmaniose Visceral.** Proposta de Elaboração Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. CONITEC, 2016.

FARIA, A. **Produção e avaliação de duas proteínas quiméricas - pq10 e pq20- quanto à imunogenicidade e uso em imunodiagnóstico para leishmaniose visceral canina.** 2014. 220 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2014.

Fernandes O, Bozza M, Pascale JM, de Miranda AB, Lopes UG, Degraive WM. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for Leishmania (Viannia). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1996;91(3):279-284.

FREITAS, E. de. **Obtenção de um antígeno para Ensaio Imunoenzimático (ELISA) a ser utilizado no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelos órgãos de Saúde Pública no Brasil.** 2010. 127 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2010.

FREITAS, R. M.; SOUZA-SANTOS, R; CODEÇO, C. T. ; OLIVEIRA, R. L. **Influence of the spatial distribution of human hosts and large size containers on the dispersal of the mosquito Aedes aegypti within the first gonotrophic cycle.** Medical Veterinary Entomology, v.24, p. 74 – 82, 2010.

Fu G, Kolesnikov AA. Leishmania gymnodactyli and Leishmania infantum minicircles contain the same guide RNA genes as do minicircles of Leishmania tarentolae. Mol Biochem Parasitol. 1994;67(1):171-4.

GALVÃO, A. **Diagnóstico de situação epidemiológica da leishmaniose Visceral canina em de Rio Verde-GO.** 2016. 259 f. Dissertação (Doutorado em medicina veterinária preventiva). Universidade Estadual Paulista- UNESP, Jaboticabal. Goiás, 2016.

GOMES, A. C.; GALATI, E. A. B.; CASANOVA, C.; et al.. **Analysis of the geographical distribution of Leishmaniasis.** Vectors in State of São Paulo. Bol. Direc.Mal. San. Amb. v. 35, p. 143-146, 1995.

GONÇALVES, S. A. et al. **Leishmaniose visceral: um desafio às políticas de saúde brasileiras.** Periódico Científico Núcleo de Biociências Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix, Belo Horizonte, MG, v. 03, n. 06, dez. 2013.

GONTIJO, C. M. F., MELO, M. N. **Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas.** Rev. Bras. Epidemiol. Vol. 7, Nº 3, 2004.

GUERRA, J. M.; FERNANDES, N. C. C. A.; KIMURA, L. M.; SHIRATA, N. K.; MAGNO, J. A.; ABRANTES, M. F.; et al. **Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico de Leishmania spp. em amostras de tecidos caninos.** Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo, 2016, 75:1686.

HENN, L. A. G. **Caracterização da leishmaniose visceral em pacientes coinfectados por HIV e fatores associados a óbito e recidiva.** 2016. 149 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública- Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

HIRSCHMANN, L. C. **LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: Investigação clínica, laboratorial e epidemiológica em cães de canis de doze municípios do Rio Grande do Sul.** 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Pelotas, 2013. IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Cidades. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=220800> Acesso em: 16 maio de 2018.

IKEDA-GARCIA, F.A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 12, n. 71, p.34-42, 2007.

JÚNIOR, M. V. S. L. de. **Análise comparativa do teste imunocromatográfico DPP- Biomanguinhos com ELISA e RIFI no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** 2014. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Programa de Fisiopatologia Experimental, São Paulo, 2014.

KILLICK-KENDRICK, R. **The life-cycles of leishmania in the sand-fly and transmission of leishmaniasis by bite.** Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum. Spain. 2002.

KOUTINAS, A. F., KOUTINAS, C. K. **Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to Leishmania infantum/chagasi.** *Veterinary Pathology*; 51(2):527-538. doi:10.1177/0300985814521248; 2014.

LIMA, W.G., MICHALICK, M.S.M., MELO, M.N., TAFURI, W.L; et al. **Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes**. Acta Tropica, Netherlands, v. 92, p. 43-53, 2004.

MAIA, C. et al. **Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using diferente tissues**. Veterinary Journal, v. 179, p. 142-144, 2009.

MAIA, L. **Leishmaniose Visceral Canina: Aspectos clínicos e hematológicos de casos suspeitos e confirmados atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília em 2011**. 2013. 43 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília, 2013.

MARCELINO, A. P.; FILHO, J. A. S. **Instruções para a realização do teste rápido imunocromatográfico Alere para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina**. Serviço de Doenças Parasitárias Laboratório de Referência Nacional em Diagnóstico da Doença de Chagas e Leishmaniose Visceral IOM – FUNED. Belo Horizonte, 2015.

MARQUES, M. I. L. M. **Leishmaniose canina**. 2008. 150 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2008.

MARTINS-MELO, F. R.; LIMA, M. S.; RAMOS, A. N. Jr.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. **Mortality and Case Fatality Due to Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Nationwide Analysis of Epidemiology**. Trends and Spatial Patterns, 2014.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; CARVALHO, R. W. **Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro**. Parasitology Today, Cambridge, v. 10, n.1, p. 34-37. 1994.

MBI. Picos (PI) –Índice de bairros e demais núcleos populacionais. Disponível em: <http://www.mbi.com.br/mbi/biblioteca/cidade/picos-pi-br/> Acesso em 16 maio de 2018.

MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. **Leishmaniose visceral americana**. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. Parasitologia Médica. Atheneu, São Paulo, c. 10, v. 1, p. 67-83, 2005.

MILLINGAN, B. G. Total DNA isolation. In: HOELZEL, A. R (org). **Molecular Genetic Analysis of Populations**. Oxford University Press: London, 1998. p. 29-60.

MOHAMMADIHA, A.; HAGHIGHI, A.; MOHEBALI, M.; MAHDIAN, R.; ABADIE, A. R.; ZAREIB, Z.; YEGANEHF, F.; KAZEMIA, B.; TAGHIPOURA, G. N.; AKHOUNDIB, B.; BARATIB, M.; MAHMOUDIA, M. R. **Canine visceral leishmaniasis: A comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmaniainfantum* infection.** *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, 2012 (article in press).

MORAIS, A. N. et al. **Canine visceral leishmaniasis and Chagas disease among dogs in Araguaína, Tocantins.** *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 225-229, abr.-jun. 2013.

MORAIS, R. C. S. **Aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real para caracterização de espécies de *Leishmania*.** 2015. 62 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

MOREIRA, P. R. R. Resposta Imune Diferenciada no Fígado e no Baço de Cães com Leishmaniose Visceral. 2013. 66 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/104664>>.

Nota técnica conjunta nº 01/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Disponível em: <http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/nota-tecnica-no.-2011_cglab_cgdt1_lvc.pdf> Data de acesso: 31 de janeiro de 2017.

Noyes HA, Reyburn H, Baley JW, Smith D. A Nested-PCR-Based Schizodeme Method for Identifying *Leishmania* Kinetoplast Minicircle Classes Directly from Clinical Samples and Its Application to the Study of the Epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clin Microbiol.* 1998;36(10):2877-2881.

OLIVEIRA TS, MIRANDA FG, RIBEIRO VM, SANTOS RL. Análise de métodos de diagnóstico para leishmaniose visceral canina a partir de levantamento de casos atendidos em uma clínica veterinária na cidade de Belo Horizonte, MG. **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 31, p. 692-696, 2011.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Leishmaniasis: Status and trends.** Disponível em: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/. Acesso em: 28 maio. 2018.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE-OPAS. **Encuentro sobre vigilancia, prevención y control de leishmaniasis visceral (LV) em el Cono Sur de Sudamérica.** Foz do Iguazú, Brasil, 2009. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=16961&Itemid. Acesso em: 26 de maio de 2018.

PENHA, T. A. **Expressão das quimiocinas MIP-1 e MCP-1 em relação à carga parasitária em cães com Leishmaniose Visceral.** 2011. 51 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

QUARESMA, P. F. **Diagnóstico Molecular da Leishmaniose Visceral Canina e Quantificação da Carga Parasitária através da Reação em Cadeia da Polimerase.** 2007. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, 2007.

QUEIROZ, J. R. E. M. **Validação do Teste Imunocromatográfico Rápido Dual Path Platform para o Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.** 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2011.

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

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P. J.; SHAW, J.; SHAW, M.; DYE, C. **Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs.** *Parasitology*, v. 122, n. 3, p. 253-261, 2001.

RAMOS, R. A. N. do. **Avaliação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da PCR em tempo real (qPCR) no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina utilizando diferentes amostras biológicas.** 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife – PE, 2012.

READY, P.D. **Epidemiology of Visceral Leishmaniasis.** Dove medical press limited, *Clinical Epidemiology*, V. 3, n. 6, p. 147-154, 2014.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARVALHO, A. T.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W. L.; OLIVEIRA, R. C. **Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis.** *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v.128, p.87-95, 2009.

REIS, L. E. S. **Detecção de *Leishmania* por PCR e suas variações (seminested PCR e PCR em tempo real), em fragmentos de pele de baço de cães com leishmaniose visceral.** 2013. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto. Minas Gerais, 2013.

REY, L. **Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ROCHA, A. G. D. **Leishmaniose Visceral Canina no Rio Grande do Sul - Revisão Bibliográfica**. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

ROGERS, W. O., WIRTH, D. F. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 565-569, 1987.

ROSPAL, A. C., ZAJAC, A. M., LINDSAY, D. S. **Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States**. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 33,921-937, 2003.

SCRIMGEOUR, E. M.; BARKER, D. C.; AL-WAILY, A.; IDRIS, M.; LAMBSON, B., NIRMALA, V.; WINDSOR, J. J. First identification of a species of *Leishmania* causing visceral leishmaniasis in the Sultanate of Oman, in a patient with AIDS. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, p. 356–357, 1998.

SHIMMING, B. C.; PINTO-SILVA, J. R. C. **Leishmaniose visceral canina**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Garça, v.x, n.19, 2012.

SILVA, S. R. da. **Análise comparativa de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares na confirmação do diagnóstico em cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral canina**. 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, na área de concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Ministério da Saúde, Belo Horizonte, 2009.

SINGH, O. P.; SUNDAR, S. **Developments in Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in the Elimination Era**. *Journal of Parasitology Research*, Cairo, ID 239469. 10 p., dez. 2015.

SMYTH, A. J., GHOSH, A., HASSAN, M. Q., BASU, D., DEBRUIJN, M. H. L., ADHYA, S., MALLIK, K. K. & BARKER, D. C. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**, v. 105, p. 183–192, 1992.

SOLANO-GALEGO, Laia et al., L. **Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis**. *Veterinary Parasitology*, v. 165, p. 1-18, 2009.

SOUSA, R. A. de.; ALVES, N. M.; ALBANO, S. G. C.; RÉGO, M. S. do.; MACHADO, L. P. **Teste Rápido Imunocromatográfico no Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina no Município de Bom Jesus, Piauí**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer- Goiânia, v. 10, n. 19; p. 17-33, 2014.

STEINDEL, M.; MENIN, A.; EVANGELISTA, T.; STOCO, P.H.; MARLOW, M.A.; FLEITH, R.C.; PILATI, C. & GRISARD, E.C. 2013. **Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil.** Pesquisa Veterinária Brasileira 33(4):490-496. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

TÁVORA, M. P.; PEREIRA, M. A.; SILVA, V. L.; VITA, G. F. **Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar Leishmaniasp. Em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol. 40 no. 4 Uberaba July/Aug. 2007.

VALENTE, P. C. L. G. **Avaliação dos métodos diagnósticos e dos parâmetros hematológicos nas hemoparasitoses caninas no estado de Minas Gerais.** 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, na área de Clínica e Cirurgia Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2014.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 25 maio. 2018.

YANG, S., ROTHMAN, R. **PCR – based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings.** The Lancet, v. 4, p. 337-348, 2004.



TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DIGITAL NA BIBLIOTECA
“JOSÉ ALBANO DE MACEDO”

Identificação do Tipo de Documento

- () Tese
() Dissertação
(X) Monografia
() Artigo

Eu, Luíssa Lucena da Silva,

autorizo com base na Lei Federal nº 9.610 de 19 de Fevereiro de 1998 e na Lei nº 10.973 de 02 de dezembro de 2004, a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar, gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação

Comparação do teste rápido com a técnica de PCR para diagnóstico de Leishmaniose Visceral Corim no município de Picos, Piauí.
de minha autoria, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, pela internet a título de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

Picos-PI 30 de feelho de 2018.

Luíssa Lucena da Silva
Assinatura