UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Aghata Regina de Oliveira Alves Palmeira

Implicações em saúde pública para diferentes técnicas diagnósticas e análise genotípica para *Leishmania* spp.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

Botucatu
2022

Aghata Regina de Oliveira Alves Palmeira

Implicações em saúde pública para diferentes técnicas diagnósticas e análise genotípica para *Leishmania* spp.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

Botucatu
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Palmeira, Aghata Regina de Oliveira Alves.
Implicações em saúde pública para diferentes técnicas diagnósticas e análise genotípica para *Leishmania* spp. / Aghata Regina de Oliveira Alves Palmeira. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Virginia Bodelão Richini Pereira
Capes: 40101096

1. Leishmaniose - Diagnóstico. 2. *Leishmania*. 3. Doenças negligenciadas. 4. Saúde pública. 5. Medicina tropical.

Palavras-chave: Diagnóstico; High Resolution Melting; Leishmanioses.

Aghata Regina de Oliveira Alves Palmeira

Implicações em saúde pública para diferentes técnicas diagnósticas e análise genotípica para *Leishmania* spp.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientador: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

Comissão examinadora:

_____

Profa. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) - Araçatuba

_____

Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) - Botucatu

_____

Profa. Dra. Luciana Raquel Vincenzi Fachin
Instituto Lauro de Souza Lima – Bauru

_____

Prof. Dr. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto
Instituto Adolfo Lutz – Núcleo de Parasitoses Sistêmicas – São Paulo

_____

Profª Drª Virgínia Bodelão Richini Pereira
Instituto Adolfo Lutz - Centro de Laboratórios Regionais – Bauru

Botucatu, 10 de outubro de 2022

"Sou muito grato às adversidades que apareceram na minha vida, pois elas me ensinaram a tolerância, a simpatia, o autocontrole, a perseverança e outras qualidades que, sem essas adversidades, eu jamais conheceria."

Napoleon Hill.

Dedicatória

À minha mãe Regina, que sempre está ao meu lado. Obrigada por todo incentivo aos estudos, por todo carinho, palavra, conforto e por sempre acreditar em mim. Como você mesmo diz: O conhecimento é a única coisa que não podem nos tirar. Te amo muito!

À minha filha tagarela Beatriz. Mamãe te ama incondicionalmente. Obrigada por ser tão carinhosa e paciente comigo. Essa jornada foi longa e só nós duas sabemos como foi passar por ela. Que bom ter você como filha, Deus foi imensamente maravilhoso em ter dado você para mim. Te amo muito minha boneca!

À minha família, que sempre faz de tudo para tornar os momentos difíceis mais brandos. Meu irmão Aron, por sempre me socorrer e me apoiar. E irmão Lincoln, mesmo longe se faz presente sempre com palavras maravilhosas. Minha irmã Paolla, pelo carinho e conforto nos momentos angustiantes. Amo vocês!!!

À minha tia Cláudia, minha confidente e amiga. Te amo tanto! E vózinha Neuza, por todo gesto de carinho, acolhimento, almoços deliciosos nos dias corridos, e infinitas coisas feitas carinhosamente. Por sempre lembrar de mim. Te amo!

Á minha cunha Milena, obrigada pelo apoio, incentivo e pelas confidencias. Te amo!

Aos meus sogros Sueli e Durvalino, obrigada por me acolherem como uma filha.

Pelos conselhos e altos papos. Vocês são essenciais e especiais na minha vida, amo vocês! Meus cunhados Ricardo e Bruna, obrigada pelo acolhimento na casa de vocês e pelas conversas deliciosas.

Ao meu lindo namorido Evandro, por toda parceria e incentivo. A pessoa que jamais me negou apoio. Obrigada por passar essa fase de muita ansiedade e algumas noites mal dormidas (rs), que se desdobrou em esforços para me ajudar. Sem você tudo seria muito mais difícil. Sou imensamente grata! Eu te amo! ♡

Agradecimentos

Agradecimentos

Agradeço à Deus pela minha vida, por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho, por me ouvir e atender sempre!

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, à coordenação e aos professores, por contribuírem durante todo o decorrer do doutorado para minha formação.

À toda equipe da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - Apta de Bauru. Dra. Simone pelas culturas e todo suporte quando precisei. Dra. Lívia e Dr. Wesley, pelas conversas, técnicas e toda ajuda nessa jornada, muito obrigada!

À equipe do CCZ Bauru pelas amostras caninas. Principalmente a Veterinária Valéria por tirar todas as dúvidas relacionadas as coletas de amostras e inquéritos sorológicos.

À equipe do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, pelas amostras cedidas. Ao Dr. Tolezano e Dra. Helena, pelas informações e tabelas a respeito das amostras. Esses dados enriqueceram ainda mais meu trabalho. Gratidão!

À toda equipe do Instituto Adolfo Lutz- Bauru, por todo acolhimento, orientação, ensinamentos e apoio. Todos esses anos junto à vocês foram essenciais para meu crescimento profissional e pessoal. Gratidão!

Ao Ricardo Andrade Zampieri, pela padronização da técnica HRM e toda ajuda na análise. Muito obrigada!

À minha querida amiga Letícia, por todo apoio, infinitas ajudas, atenção em várias etapas

deste trabalho. Com certeza sem você, teria sido muito mais difícil. Sou imensamente grata! ♡

À Lorena, Laisinha, Laís (Campinas) e Bah, por ajudar em todas as vezes que solicitei. Vocês foram essenciais!

À todos os membros da banca examinadora. Agradeço por cada contribuição neste trabalho.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – 88882.432954/2019-01 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – 2015/17519-4.

À minha orientadora Virgínia, primeiramente por aceitar me orientar, por todos ensinamentos e "puxões de orelha". Pela atenção, paciência e principalmente por acreditar em meu potencial. Foram 6 anos de muito aprendizado. Quando olho para trás, sinto orgulho de tudo que vivi e muito feliz pela escolha certa. Meu muito obrigada! Gratidão!

RESUMO

Resumo

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, consideradas doenças negligenciadas e um grave problema de saúde pública, causando prejuízos sociais e econômicos em países tropicais e subtropicais. Este estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de *Leishmania* spp. em cães e animais silvestres, provenientes do estado de São Paulo por meio do crescimento primário e isolamento do parasito na cultura; Teste rápido imunocromatográfico (TR-DDP); ensaio imunoenzimático (ELISA); Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR); Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR); análises de dissociação de DNA em alta resolução (HRM) e posteriormente sequenciamento genético para identificação das espécies não discriminadas no HRM. De um total de 191 amostras biológicas, 180 (94,2%) eram procedentes de cães e 11 (5,8%) de animais silvestres. Das 180 amostras biológicas caninas, 32 (17,8%) foram cultivadas em meio NNN-LIT, tendo-se observado uma (3,1%) amostra de aspirado de linfonodo positiva. Todas as amostras caninas foram reagentes no TR-DDP e ELISA. A detecção molecular na técnica cPCR, utilizando os *primers* LINR4/LIN19, amplificou 151/191 (79,1%) amostras, já a qPCR amplificou 72/191 (37,7%) amostras utilizando *primers* HSP70F/R. Por meio da técnica de HRM, utilizando o *amplicon 1*, 55/191 (28,8%) amostras foram discriminadas como *Leishmania infantum*. Os resultados dessa pesquisa evidenciaram a identificação da espécie *Leishmania infantum* em 53/180 (29,4%) amostras procedentes de cães domésticos, e 2/11 (18,2%) amostras de animais silvestres. Desse modo, o estabelecimento de protocolos otimizados de detecção e identificação dos agentes causadores das leishmanioses torna-se extremamente útil para os estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: Leishmaniose, diagnóstico molecular e *High Resolution Melting*.

ABSTRACT

Abstract

Visceral Leishmaniasis is a zoonosis infection caused by *Leishmania* genus, is a neglected disease and a serious public health problem that causes social and economic damage in tropical and subtropical countries. This study aimed to investigate the occurrence of Leishmania spp. in dogs and wild animals from the state of São Paulo through primary growth and isolation of the parasite in blood cultures; Rapid immunochromatographic test (TR-DDP); enzyme immunoassay (ELISA); Conventional Polymerase Chain Reaction (cPCR); Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR); high resolution DNA dissociation analysis (HRM) and later genetic sequencing to identify species not discriminated in the HRM. From a total of 191 biological samples, 180 (94,2%) were from dogs and 11 (5,8%) from wild animals. Of the 180 canine biological samples, 32 (17,8%) were cultured in NNN-LIT medium, with one (3,1%) positive lymph node aspirate sample. All canine samples were reactive in TR and ELISA. Molecular detection in the cPCR technique using LINR4/LIN19 primer, amplified 151/191 (79,1%) samples, while qPCR amplified 72/191 (37,7%) samples using HSP70F/R primer. By means of the HRM technique using amplicon 1, 55/191 (28,8%) samples were discriminated as *Leishmania infantum*. The results of this research showed the identification of the *Leishmania infantum* species in 53/180 (29,8%) samples from domestic dogs, and 2/11 (18,2%) samples from wild animals. Thus, the establishment of optimized protocols for the detection and identification of the causative agents of leishmaniasis becomes extremely useful for epidemiological studies.

Keywords: Leishmaniasis, molecular diagnosis and *High Resolution Melting***.**

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
µl	Microlitro
µM	Micrometro
APTA	Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
BEPA	Boletim Epidemiológico Paulista
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
cPCR/PCR	Reação em Cadeia da Polimerase convencional
Ct	Cycle Threshold
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DIVE	Divisão de Vigilância Epidemiológica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA/EIE	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
g6pd	Gene da glicose-6-fosfato desidrogenase
GVE	Grupo de Vigilância Epidemiológica
HCL	Cloreto de Hidrogênio
HRM	High Resolution Melting
HSP70	70Dka heat shock proteins – hsp70
ITS	Internal Transcribed Spacers
KC	Cloreto de potássio
kDNA	DNA do Minicírculo do Cinetoplasto
LASAB	Laboratório de Sanidade Animal de Bauru
LC	Leishmaniose cutânea

LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LD	Leishmaniose disseminada
LIT	Liver Infusion Tryptose
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
M	Mol
$MgCL_2$	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
ng	Nanograma
NNN	Novy, MacNeal, Nicolle
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAHO	Pan American Heath Organization
Pb	Par de base
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PH	Potencial Hidrogeniônico
PVCLV	Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotação por Minuto
SAA	Secretaria de Agricultura e Abastecimento
SES	Secretaria Estadual de Saúde
SP	São Paulo
SSUrRNA	Subunidade do RNA Ribossomal

TBE	Tris-borato-EDTA
Tm	Temperatura de melting/dissociação
TR	Teste Rápido
TRIS	Tris (hidroxymetil) aminometano
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
USA	United States of America
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
WHO	World Heath Organization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ciclo de vida da *leishmania*. 29

Figura 2- Números totais de casos autóctones anuais de leishmaniose tegumentar americana em municípios do estado de São Paulo, entre 1998 e 2020. 36

Figura 3- Números totais de casos autóctones anuais de leishmaniose visceral em municípios do estado de São Paulo, entre 1999 e fevereiro de 2022. 38

Figura 4- Números totais de casos e óbitos de leishmaniose visceral nos municípios do estado de São Paulo, distribuídos por GVE entre 1999 e fevereiro de 2022. 39

Figura 5- Casos humanos autóctones de leishmaniose visceral nos municípios do estado de São Paulo, entre 1999 a 2017. 40

Figura 6- Organograma das amostras do estudo. 54

Figura 7- Mapa do Estado de São Paulo e os respectivos municípios envolvidos na pesquisa. 55

Figura 8- Armadilha de arame galvanizado para captura de animais silvestres. 56

Figura 9- Lesão base de cauda de *Proechimys iheringi*. 56

Figura 10- Manchas hipocrômicas na cauda *Proechimys iheringi*. 57

Figura 11- Punção aspirativa em cães domésticos no CCZ de Bauru. 58

Figura 12- Kit illustra™ blood genomicPrep Mini Spin (GE Healthcare). 61

Figura 13- Espectrofotômetro Epoch™ (BioTek, USA). 62

Figura 14- Amostras caninas amplificadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. .624

Figura 15- Termociclador StepOne™ Plus Real Time PCR System (Life Technologies, USA). 65

Figura 16- Mapa de localização dos amplicons no gene hsp70 utilizados nesse trabalho. 69

Figura 17- Curva de amplificação de DNA de *Leishmania* spp. em diferentes materiais biológicos de cães domésticos e animais silvestres. 78

Figura 18- Curva melting do grupo controle negativo e amostras negativas. 78

Figura 19.A- Curva-padrão de amplificação de DNA de *Leishmania* spp., obtidas com PCR em tempo real baseado em SYBR Green. 80

Figura 19.B- Curva-padrão de amplificação de DNA de Leishmania spp., obtidas com PCR em tempo real baseado em SYBR Green. 80

Figura 20- Quantificação da carga parasitária de *Leishmania* a partir da qPCR. 81

Figura 21- Padronização da curva de Melting com cepas padrão de DNA de *Leishmania* utilizando os *primers* HSP70. *Leishmania amazonensis* curva vermelha, *Leishmania infantum* curva amarela e *Leishmania braziliensis* curva verde. A e B: Formação de pico único na curva de Melting. 81

Figura 22- Padronização do ensaio HRM utilizando os *primers* HSP70. Amostras biológicas analisadas sem diluição após a pré amplificação. 82

Figura 23- Ensaio de HRM (amplicon 1) – Curva melting das cepas padrão de *Leishmania*, amostras caninas e animais silvestres positivas, com temperaturas pré e pós melting de 83.3- 83.6 e 87.2- 87.5 respectivamente. 83

Figura 24- Ensaio de HRM (amplicon 1). Valores de temperatura pré-melting 83.3-83.6 e pós-melting 87.2-87.5 das cepas padrão de *Leishmania*. 84

Figura 25- Ensaio de HRM (amplicon 1) - Cepas padrão de *Leishmania* e amostras positivas classificadas como *Leishmania braziliensis.* 85

Figura 26.A- Ensaio de HRM (amplicon 1) - Cepas padrão de *Leishmania* e repetição de amostras positivas classificadas como *Leishmania infantum*. 86

Figura 26.B- Ensaio de HRM (amplicon 1) - Cepas padrão de *Leishmania* e repetição de amostras positivas classificadas como *Leishmania infantum* 87

Figura 27- Amostras classificadas como “Variantes”. Valores da Tm diferente das cepas controles.....90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Material biológico de animais silvestres para diagnóstico de *Leishmania* spp. .52

Tabela 2. Material biológico de cães domésticos com suas respectivas localidade e ano de coleta. 53

Tabela 3. Coletas de material biológico caninas realizados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ)**.**. 54

Tabela 4. Coletas de material biológico de cães domésticos realizados no CCZ de Bauru para cultivo em cultura. 59

Tabela 5. Protocolo de teste de eficiência, com concentrações diferentes dos *primers* forward e reverse utilizado na qPCR para o alvo HSP70. 66

Tabela 6. Protocolo de qPCR utilizado para o alvo HSP70 com suas respectivas concentrações, reagentes e quantidades por amostra. 67

Tabela 7. Protocolo de pré amplificação utilizado para o alvo HSP70. 68

Tabela 8. *Primers* utilizados na análise de HRM, desenhados para a região alvo da proteína de choque térmico HSP70. 69

Tabela 9. Protocolo de reagente utilizado no preparo da reação de HRM. 70

Tabela 10. Amostras caninas analisadas pelo ensaio Imunoenzimático ELISA, com diagnóstico reagente para *Leishmania* spp. e suas respectivas localidades.....73

Tabela 11. Amostras caninas cultivadas no meio LIT+NNN, que apresentaram formas sugestivas de promastigotas de *Leishmania* spp. 74

Tabela 12. Relação de amostras positivas e negativas na análise de cPCR para o *primer* GAPDH, em amostras de cães domésticos e animais silvestres. 75

Tabela 13. Relação da análise de cPCR para Leishmania spp., utilizando os *primers*

LINR4/LIN19 em amostras caninas e animais silvestres. 76

Tabela 14. Relação da análise de cPCR para *Leishmania* spp., utilizando os *primers* LINR4/LIN19 em amostras caninas e animais silvestres, por localidade e espécie de animal. 77

Tabela 15. Relação de todas as amostras de cães domésticos e animais silvestres, identificados na análise de HRM para *Leishmania infantum*, ultizando *primers* direcionados para a região HSP70. 89

SUMÁRIO

1. Introdução 27
1.1 Leishmaniose Tegumentar 29
1.5 Diagnóstico das Leishmanioses 40

2. Objetivos 50

2.1 Objetivo geral 50

2.2 Objetivos específicos 50

3. Material e métodos 52
3.1. Aspectos éticos 52
3.2. Material biológico 52
3.2.1. Animais Silvestres 52
3.2.2. Cães 53
3.2.3. Local de estudo e procedência dos animais 54
3.2.4. Coleta das amostras silvestres 55
3.2.5. Coleta das amostras caninas 57
3.3. Análise sorológica 59
3.3.1. TR-DDP 59
3.3.2. ELISA 60
3.4. Isolamento 60
3.4.1. Leituras 60
3.4.2. Preparo das culturas para extração de DNA 60
3.5. Análise molecular 61
3.5.1 Preparo das culturas 61
3.5.2 Extração DNA 61
3.5.3. Quantificação DNA 62
3.6. Diluição de *primers* 62
3.7. Reação em cadeira da polimerase convencional – cPCR 62
3.7.1. Visualização do material amplificado 63
3.8. Reação em cadeira da polimerase em tempo real - qPCR 64

3.8.1. Padronização das reações de qPCR 65
3.8.2. Ensaios de linearidade da qPCR 67
3.8.3. Quantificação da carga parasitária de amostras caninas e animais silvestres 67
3.9. HRM – High Resolution Melting 67
3.9.1. Pré-amplificação a partir de PCR convencional 68
3.9.2. Análise de dissociação pela curva de Melting 69
3.10. Sequenciamento 70
4. Resultados 73
4.1. Provas sorológicas 73
4.1.2. ELISA 73
4.2. Cultura 73
4.3. Provas moleculares 74
4.3.1. Quantificação de DNA 74
4.3.2. PCR convencional (cPCR) 74
4.3.2.1. Análise da integridade do DNA 74
4.3.2.1. cPCR com primers LINR4/LIN19 75
4.3.3. PCR em tempo real 77
4.3.3.1. Quantificação de DNA a partir da qPCR 79
4.3.4. HRM 81
5. Discussão 94
6. Intercorrências 109
7. Conclusões 112
Referências 114
Anexos 141
Apêndices 156

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Os tripanosomatídeos são protozoários flagelados, da família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida. Estão divididos em 10 gêneros: *Herpetomonas, Crithidia, Blastocrithidia, Leptomonas, Wallaceina, Sergeia, Phytomonas, Endotrypanum, Leishmania e Trypanosoma* (Borghesan, 2013).

Os principais integrantes dessa família são os protozoários dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, ambos apresentam um ciclo de vida complexo envolvendo hospedeiros vertebrados e insetos vetores, causando doenças conhecidas como Leishmaniose e Doença de Chagas (Tirlens; Hellemond, 1998).

Descrita pela primeira vez em 1885 por Cunningham (Hart, 1986), as leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários classificados em duas linhagens filogenéticas Euleishmania e Paraleishmania, sendo os subgêneros *Leishmania e Viannia*, os mais importantes do ponto de vista de saúde pública (Akhoundi *et al.*, 2016; Espinosa *et al*., 2016).

Estas consistem em uma das mais prevalentes doenças vetoriais no mundo, estando entre as dez principais doenças negligenciadas (PAHO, 2017), com uma ampla distribuição global, onde a maioria dos casos ocorre nas Américas, leste e norte da África e oeste e sudeste da Ásia (WHO, 2020a). Globalmente, a leishmaniose infecta mais de 12 milhões de pessoas, 700.000 a 1 milhão de novos casos por ano, entre 20.000 e 30.000 mortes e 350 milhões de pessoas em risco de infecção (PAHO, 2017; WHO, 2022).

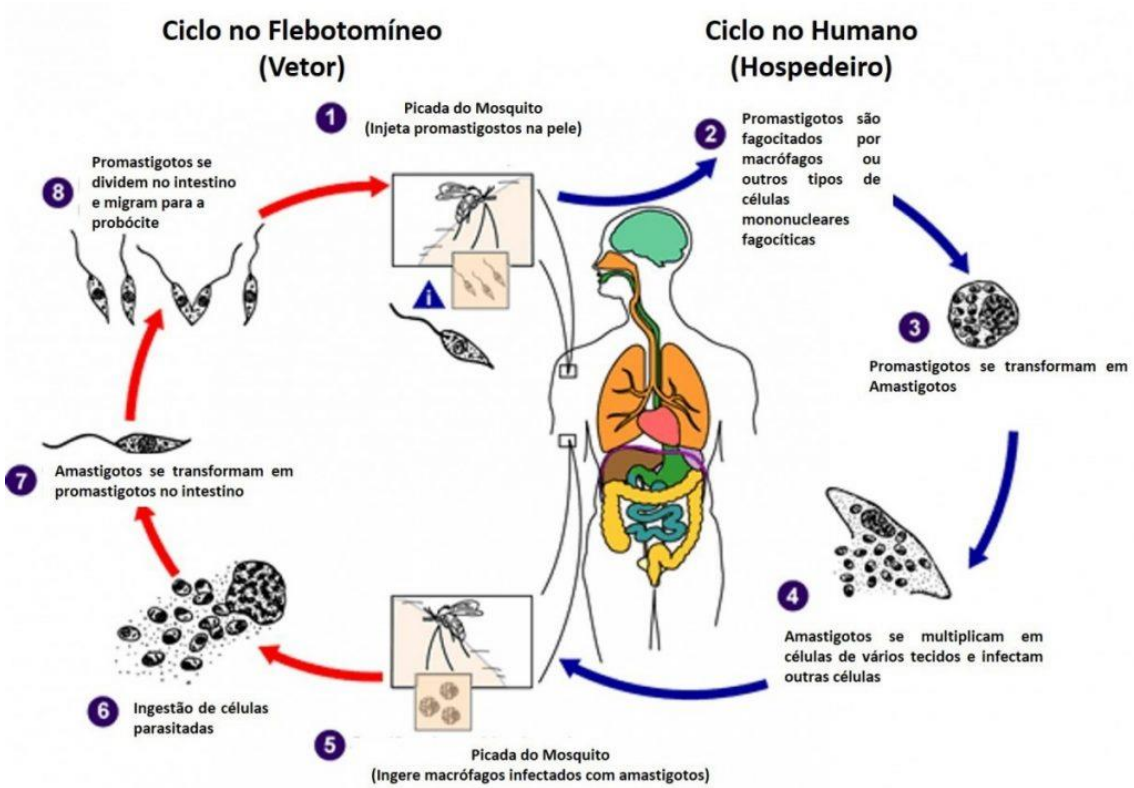
A transmissão do parasito ocorre por meio da picada de espécies vetoras de flebotomíneos infectadas, pertencentes à Ordem Diptera, da Família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia, Phlebotomus* entre outros gêneros (De Assis *et al*., 2014).

Os flebotomíneos são insetos dípteros, pequenos, coloração amarelada e hábitos crepusculares, conhecidos popularmente como "Birigui", “asa

branca", "mosquito palha", entre outros. Com hábitos de vida noturno, adaptados aos ambientes com matéria orgânica e podem ser encontrados no intra e peridomicílio. Além disso, possui de 2 a 3 mm comprimento e inocula o parasito durante o repasto sanguíneo no organismo vertebrado (Brasil, 2014a; PAHO, 2017; WHO, 2020b).

O ciclo de vida de *Leishmania* spp. envolve alternância entre hospedeiros invertebrados e mamíferos. Nos flebotomíneos, o hábito de hematofagia é feito exclusivamente pelas fêmeas do vetor, pois necessitam alimentar-se de sangue para maturação dos ovos, assim quando realizam o repasto sanguíneo em mamíferos, inoculam formas flageladas (promastigotas) localizadas na parte anterior do intestino do mosquito na junção derme-epiderme. No intestino do mosquito, ocorre a lise dos macrófagos devido a mudança de temperatura e ao aumento do pH. Inicia-se então a transformação de amastigota em promastigota com uma alta capacidade de replicação, após migram para a probóscide, onde irá transmitir o protozoário para um novo hospedeiro durante o repasto sanguíneo (Montalvo *et al*., 2012; Conceição-Silva *et al*., 2014). As promastigotas metaciclícas são fagocitadas pelo sistema fagocitário mononuclear, perdendo seus flagelos e se transformam em amastigotas por fissão binária (Gushi, 2008), cuja forma encontramos nos tecidos, e são responsáveis pela infecção. Após intensa multiplicação, o macrófago se rompe liberando as amastigotas para o meio extracelular. O ciclo de vida se encerra quando uma nova fêmea das espécies de mosquito mencionadas se alimenta com o sangue do vertebrado, ingerindo com ela macrófagos infectados (Figura 1).

Figura 1- Ciclo de vida da *leishmania*.



Fonte: CDC com modificações.

As diferentes espécies de *Leishmania* causam infecções com distintos quadros clínicos que podem ser discretos (oligossintomáticos), moderados e graves, com classificação da doença em: leishmaniose tegumentar (LT) que é subdividida em leishmaniose cutânea, muco-cutânea, cutânea difusa e disseminada e leishmaniose visceral (LV) ou calazar, com acometimento das vísceras (Kafetzis, 2013). Estas diferenças estão relacionadas a características biológicas do parasito, hospedeiros e vetores, bem como influenciadas por fatores ambientais, socioeconômicos e mudanças no desenvolvimento econômico e manuseio da terra (Gebreyes *et al*., 2020).

1.1 Leishmaniose Tegumentar

A LT é uma doença não contagiosa conhecida como Úlcera de Bauru, Nariz de Tapir ou Botão do Oriente, possui diferentes padrões de transmissão,

sendo uma doença de alta complexidade que provoca úlceras na pele e mucosas. Está presente em 85 países dos quatro continentes no mundo: Américas, Europa, África e Ásia, com 0,7 a 1,3 milhão de casos por ano (BRASIL, 2017).

O primeiro registro no Brasil, foi em 1909 por Lindenberg, que também sugeriu a nomeação por conta das manifestações clínicas ulcerosas observadas (Basano, 2004; Vale; Furtado, 2005).

No Brasil há registros de casos humanos em todas as regiões do país (BRASIL, 2017), com maior prevalência de casos nas regiões norte, nordeste e centro-oeste em seguida as regiões sudeste e sul (BRASIL, 2021).

De acordo com as formas clínicas, a LT pode ser dividida: Leishmaniose cutânea (LC) forma mais comum caracterizada por uma pápula eritematosa que surge no local da picada do vetor evoluindo para uma úlcera; Leishmaniose disseminada (LD), caracterizada pelo surgimento de várias lesões papulares que geralmente acometem a face e o tronco; Leishmaniose muco-cutânea (LMC), considerada mutiladora apresenta lesão secundária principalmente na orofaringe e demais áreas associadas; Leishmaniose cutânea difusa (LCD), que inicia com lesão única e má resposta ao tratamento, evoluindo para múltiplas nodulações não ulceradas (Lima JR, 2017).

Já foram identificadas sete espécies envolvidas nos casos de LT no Brasil, sendo três classificadas como principais: *Leishmania (Leishmania) amazonensis, Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *L. (L.) amazonensis* - distribuída em florestas primárias e secundárias da Amazônia legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão). No Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-oeste (Goiás) e Sul (Paraná); *Leishmania (V.) braziliensis* – a espécie mais importante, sendo a primeira espécie a ser incriminada como agente etiológico da LT. Distribuída desde a região do sul do Pará ao Nordeste, regiões do Centro-Oeste e Sudeste (estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro); *L. (V.) guyanensis* – distribuída em florestas que alagam em períodos de chuva, na Região Norte

(Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) até Guianas (BRASIL, 2017).

Quanto ao subgênero *Viannia*, *L. (V) lainsoni, L. (V) naiffi*, *L. (V) shawi* e *L. (V.) lindenberg* foram identificadas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (BRASIL, 2017).

No Brasil, as espécies envolvidas na transmissão da doença são: *Lutzomyia (Nyssomyia) antunesi*, *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*, *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* e *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* (BRASIL, 2017).

No ambiente silvestre, os principais reservatórios de *L. braziliensis* são roedores e marsupiais (Sales *et al*., 2019). Já de *L. guyanensis* os reservatórios são mantidos pela preguiça-real (*Choloepus didactylus*), tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) e gambá-comum (*Didelphis marsupialis*) (Dedet *et al*. 1989). Os marsupiais como *D. marsupialis*, possuem um papel importante em áreas antropizadas (Lainson e Shaw, 1998), pois esses animais acabam servindo de fonte de infecção ao se alimentarem no peridomicílio, podendo criar uma conexão entre meio silvestre e urbano (Guerra *et al*., 2006).

A infecção por *leishmania* em animais domésticos podem representar um papel importante na disseminação do parasita, principalmente na região do peridomicílio, onde há uma maior quantidade de vetores (Aguilar *et al*., 1989). Alguns estudos, também sugerem que animais silvestres possuem um potencial na transmissão zoonótica da doença no Brasil (Lima *et al*., 2012; Tenório *et al*. 2014; Paniz, 2019).

São descritas a existência de três perfis epidemiológicos para LT: Silvestre, no qual ocorre a transmissão entre os animais silvestres, em áreas florestais (vegetação primária), sendo considerada uma zoonose de animais silvestres; ocupacional ou lazer, que está associado à exploração desordenada das florestas, desenvolvimento de atividades agropecuárias e o ecoturismo, caracterizando uma antropozoonose; e rural ou periurbano, no qual ocorrem em áreas de colonização (zoonose de matas residuais) ou periurbana, em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio (zoonose de matas residuais e/ou

antropozoonose) (Makowiecky *et al*., 2016).

No estado de São Paulo, existem dois perfis de transmissão: o primeiro, envolvendo o humano no ciclo enzoótico silvestre e o segundo, relacionado com a transmissão domiciliar, em áreas que ocorreram diversas modificações do ambiente natural (SES, 2017).

1.2 Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose visceral (LV) é uma doença potencialmente mais grave quando se comparada a forma tegumentar. É uma zoonose caracterizada por vários sintomas moderados que podem evoluir para o quadro clássico (febres irregulares, perda de apetite, anemia, hepatomegalia, esplenomegalia, emagrecimento, tosse e diarreia, quando não tratadas podem causar morte em mais de 90% dos casos (Queiroz et al., 2004; PAHO, 2017; Gontijo; Melo, 2004).

Na Ásia e África a doença é causada pela espécie *L. (L) donovani*. No Mediterrâneo, Ásia Central, Oriente Médio, Américas do Sul e Central, por *L. (L) infantum* (Burza; Croft; Boelaert, 2018).

Nas Américas, a leishmaniose visceral é endêmica em 12 países, sendo a maioria dos casos no Brasil. Também está presente na África Oriental e no Sudeste Asiático. Estima-se que ocorram 50.000 a 90.000 novos casos por ano no mundo, sendo que apenas 25 a 45% deles são relatados à OMS (PAHO, 2019; WHO, 2022).

O primeiro registro no Brasil foi em 1913, com material de necropsia no Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2014a). Inicialmente a doença foi descrita como uma endemia rural, e a partir de 1980 expandiu-se para os centros urbanos (Werneck, 2016).

No ano de 2006, o Ministério da Saúde implementou no Brasil, o Programa de Vigilância e Controle da LV (PVCLV), que prevê ações para conter o avanço da doença no país, diminuindo a morbidade e letalidade. Medidas como redução dos flebotomíneos, eliminação de reservatórios da doença,

aperfeiçoamento das metodologias para dar celeridade ao diagnóstico e rápida disponibilidade de tratamento (Werneck, 2016).

A leishmaniose visceral é descrita nas cinco regiões do Brasil, acometendo 24 das Unidades da Federação (DIVE, 2017; BRASIL, 2017). 90% dos casos relatados na América Latina ocorrem no Brasil (Brasil, 2022).

No Brasil, 229 espécies vetoras foram identificadas (Tempone; Pitaluga; Traub-Cseko, 2014), sendo as principais relacionadas com os casos de LV, as espécies *Lutzomyia longipalpis* (*Lu. longipalpis)* e *Lutzomyia cruzi* (*Lu. cruzi)* (SES, 2022a; Foganholi; Zappa, 2011).

Antigamente a leishmaniose visceral era problema exclusivamente silvestre e restrito às áreas rurais do Brasil, porém hoje o perfil não é mais esse (Zorzetto, 2008). O vetor se adaptou ao ambiente urbano, dispersando a doença em todo território brasileiro, atingindo as regiões Norte, Sul, Nordeste, Sudeste e Centro-oeste do país (BRASIL, 2014a; Oliveira *et al.,* 2016, Rodrigues *et al*., 2017).

No ambiente urbano, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é o principal reservatório da LV, sendo um dos alvos nas medidas de controle da doença (MS, 2016). E geralmente, os casos caninos precedem os casos em humanos (Brasil, 2006). E observa-se também a sobreposição de casos humanos e caninos em áreas urbanas (Ursine *et al*., 2016; Campos *et al*., 2017).

Os principais reservatórios no ciclo silvestre que participam da transmissão para outros animais e humanos, são os canídeos, cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e gambás (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*) (WHO, 2010; Kuhls *et al*., 2011). Alguns trabalhos relataram infecção por *L. infantum* em mamíferos silvestres (Paiz, 2015), em carnívoros silvestres (Del Río *et al*., 2014) e roedores (Navea-Pérez *et al*., 2015).

Os cães infectados, podem permanecer assintomáticos por um longo período, pois o período de incubação varia de três a sete meses, dificultando no diagnóstico e favorecendo a transmissão da doença (Brodskyn; Kamhawi, 2018).

A Leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica que afeta

tanto as vísceras quanto a pele do animal, de acordo com os sinais clínicos, podem ser classificados em quatro categorias: assintomáticos: ausência de sinais clínicos; oligossintomáticos: presença de adenopatia linfóide, pelo opaco e pequena perda de peso; sintomáticos: presença de alguns sinais e polissintomáticos: vários sintomas, podendo haver alterações cutâneas como, alopecia, eczema e úlceras , onicogrifose, emagrecimento acentuado, paresia dos membros posteriores e ceratoconjuntivite (SES, 2022b; BRASIL, 2014a).

O diagnóstico da LVC é de extrema importância, para que o controle da disseminação de *L. infantum* sejam realizados. Devido a reações cruzadas com outras doenças, é realizado uma associação de dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. O Ministério da Saúde preconiza duas técnicas sorológicas, o teste imunocromatográfico (TR DPP®) e ELISA, sendo um teste rápido para triagem e o segundo confirmatório (SES, 2022b).

Além dos cães, outras espécies de animais também podem se infectar, tais como: roedores (Jusi, 2011), marsupiais, animais de produção, canídeos silvestres, gatos, primatas entre outras (Gramicccia *et al*., 1982; Luppi *et al*., 2008; Caldart *et al*., 2017; Alves-Martins, 2017). Estes achados sugerem que estas espécies podem atuar como um reservatório para *Leishmania* spp.

1.4 Leishmanioses no estado de São Paulo

Em meados 1907 e 1908, eclodiu a epidemia de Leishmaniose Tegumentar durante à construção da Estrada de Ferro Noroeste, disseminando a doença por toda Alta Sorocabana, Alta Paulista e região noroeste do estado, acompanhando a entrada do homem e a derrubada de matas (Barata, 2000).

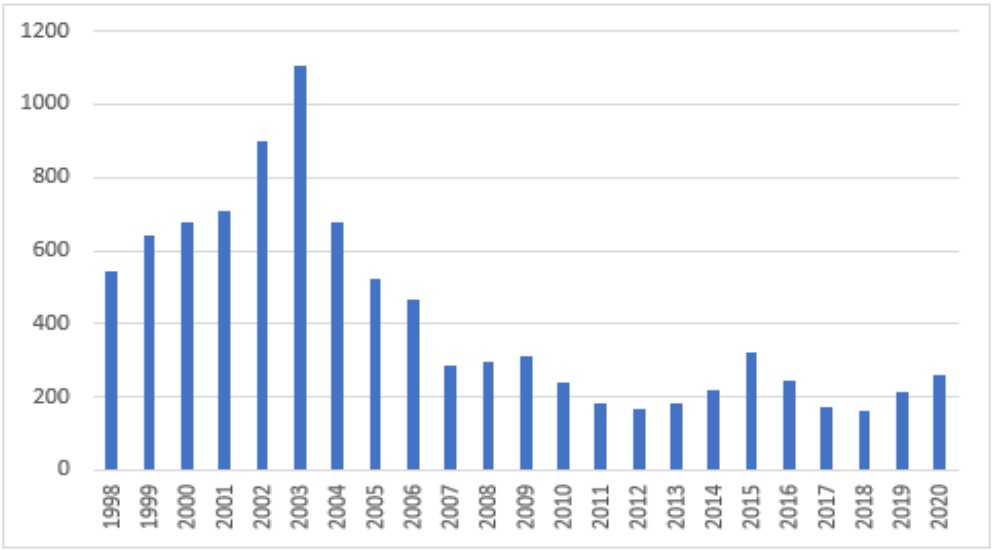
Vale enfatizar, que o termo popular “úlcera de Bauru” surgiu em virtude desse surto, cujo trabalhadores estavam acampados no município de Bauru. Durante esse período, ocorreram surtos em outros municípios do estado de São Paulo (Bauru, 1910; Pirajuí, 1914; Birigüi e Penápolis, 1917; Araçatuba,

1919), envolvendo os trabalhadores, moradores da vila e os povoados recém instalados. (Pessoa, 1941).

A primeira descoberta de indivíduos com formas de *Leishmania*s em úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas, ocorreu em 1909 por Lindenberg, em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos na construção de rodovias no interior de São Paulo. E em 1922, Aragão, demonstrou pela primeira vez o papel do flebotomíneo na transmissão da doença e Forattini (1958) descobriu roedores silvestres nas áreas florestais do estado de São Paulo, parasitados com *Leishmania*. A partir dessas descobertas, a transmissão da leishmaniose tegumentar, vem sendo descrita em vários municípios do Brasil (Brasil, 2017).

Observa-se que no estado de São Paulo, a leishmaniose tegumentar cresceu junto ao desmatamento associado a agricultura no centro-oeste do estado (Shimabukuro *et al*., 2010; Moretti; Ferreira, 2011). De acordo com os dados do Centro de Vigilância Epidemiológica, os casos de leishmaniose tegumentar foram diminuindo a partir de 2004 (Figura 2). E observa-se também, que o período entre 1998 e 2020, foram notificados 9.498 casos humanos de LT (Figura 2), com maior número de transmissão da doença, em 2003 com 1.103 novos casos.

Figura 2- Números totais de casos autóctones anuais de leishmaniose tegumentar americana em municípios do estado de São Paulo, entre 1998 e 2020.



Fonte: Adaptado do CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac".

O estado de São Paulo, apresenta elevado número de indivíduos infectados com diversas espécies de protozoários do gênero Leishmania, o uso de habitações e bairros próximos a fragmentos florestais e unidades de conservação, podem ter contribuído para a sua dispersão. O que reforça a necessidade de novos estudos epidemiológicos para uma maior compreensão da rede de transmissão da doença nos municípios e que possam auxiliar nas estratégias de ação do programa às realidades locais.

O primeiro caso de leishmaniose visceral no estado de São Paulo, foi um relato registrado em cães no município de Araçatuba no ano de 1998. Um ano depois, foi confirmado um caso humano autóctone da leishmaniose visceral humana (Galimberti *et al.*, 1999), disseminando para o sentido sudoeste em direção à região de Bauru.

A expansão da leishmaniose pode estar relacionada principalmente à construção do gasoduto Brasil-Bolívia (1997- 1999) que recrutou trabalhadores de Mato Grosso do Sul, região endêmica, a ferrovia noroeste e rodovia Marechal Rondon (Cardim *et al*., 2013; Sevá *et al*., 2017), e a partir dessas rotas, a

disseminação expandiu para outras regiões no sentido sul (Presidente Prudente e Marília) e norte (São José do Rio Preto) (Cardim *et al*., 2013).

Em 1999 foi notificado um caso no município de Birigui, dois casos em Valparaíso no ano de 2000 e no ano seguinte foram registrados 29 casos humanos em Araçatuba, cinco casos humanos no município de Penápolis e cinco casos em Mirandópolis, revelando a rapidez na expansão da doença (CVE, 2022b).

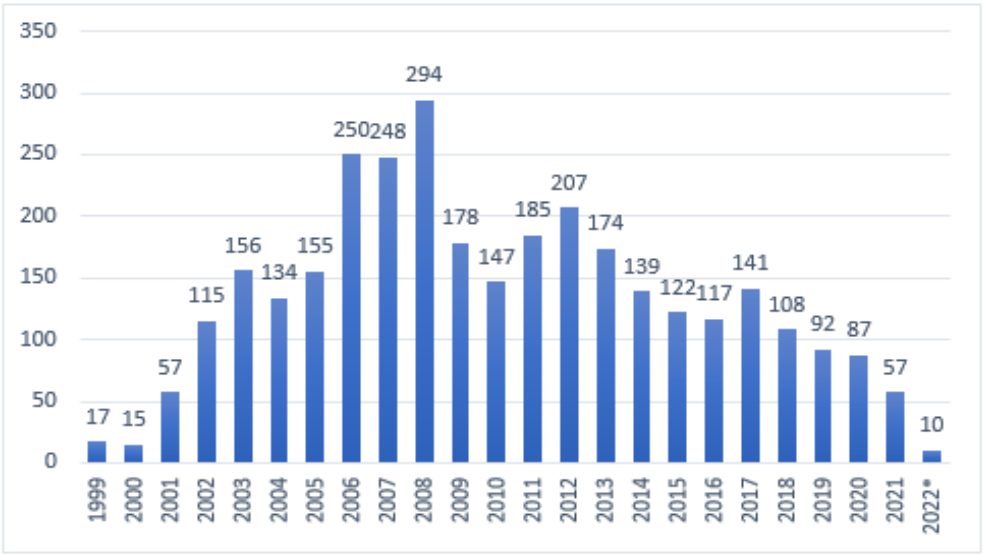
Bauru é uma área endêmica para leishmaniose, com o primeiro caso humano de leishmaniose visceral relatado no ano de 2003 e logo em seguida mais 14 casos foram confirmados. Foram registrados casos humanos em todos os anos seguintes, com picos no ano de 2006 (72 casos) e no ano de 2008 (79 casos) (CVE, 2022b).

Alguns autores apontam a participação ativa de cães assintomáticos como fonte de infecção para o flebotomíneo, principalmente os que vivem em áreas endêmicas (Marcondes; Rossi, 2013).

De acordo com a Secretaria de Saúde do estado de São Paulo, no período de 2014 a 2017, foram confirmados 525 casos de LV e 44 óbitos, enquanto, somente no Grupo de Vigilância Epidemiológica (GVE) Bauru foram notificados 120 casos com 5 óbitos (São Paulo, 2018).

No período de 1999 a fevereiro de 2022, foram notificados 3.205 casos humanos de LV e 282 óbitos (Figura 3). Vale ressaltar que a maior representatividade de transmissão foi do GVE de Araçatuba, que notificou 1.165 casos e 120 óbitos (CVE, 2022a; CVE, 2022b) (Figura 4).

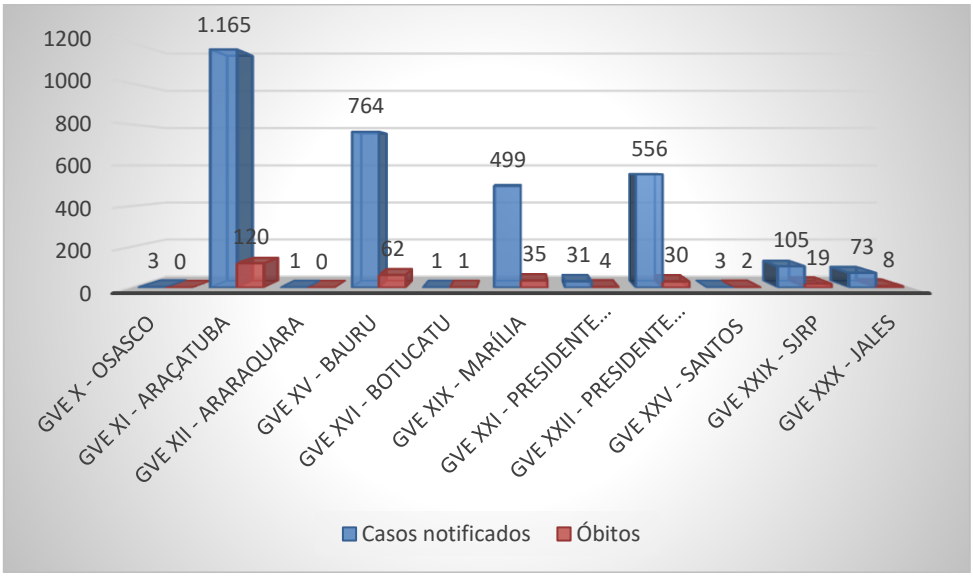
Figura 3- Números totais de casos autóctones anuais de leishmaniose visceral em municípios do estado de São Paulo, entre 1999 e fevereiro de 2022.



Fonte: Adaptado do CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac"

Segundo os dados do Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac", o maior número de casos e óbitos notificados foi observado no ano de 2008, com 294 casos e 24 óbitos, resultando em uma letalidade de 8,6% (CVE, 2022b) (Figura 4).

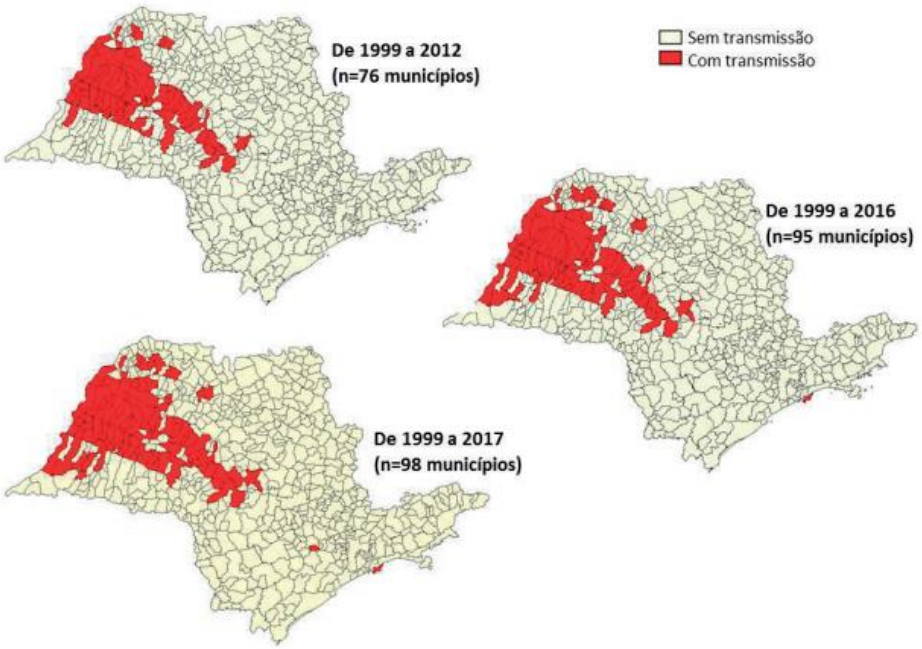
Figura 4- Números totais de casos e óbitos de leishmaniose visceral nos municípios do estado de São Paulo, distribuídos por GVE entre 1999 e fevereiro de 2022.



Fonte: Adaptado do CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac"

No período de 2012 a 2016, ocorreu um aumento de 25% de munícipios com transmissão autóctone de LV, o que indica uma maior expansão territorial da doença (Figura 5). Em 2017, mais três municípios apresentaram transmissão autóctone de LV, totalizando 98 municípios no Estado de São Paulo (Figura 5) com 75% dos casos da doença (Hiramoto *et al*., 2019).

Figura 5- Casos humanos autóctones de leishmaniose visceral nos municípios do estado de São Paulo, entre 1999 a 2017.



Fonte: Dados obtidos do Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA) do ano 2019.

1.5 Diagnóstico das Leishmanioses

O diagnóstico clínico é baseado nas manifestações clínicas de cada doença, sendo para LV, por exemplo, indivíduos com febre e esplenomegalia, associado ou não à hepatomegalia. Já para LT, os critérios são baseados na fisiopatogenia a partir do local da picada do vetor, aspecto e localização das lesões, com presença de úlceras na forma cutânea ou mucosa. Além do diagnóstico clínico, temos o diagnóstico laboratorial com as técnicas parasitológicas, sorológicas, imunológicas e os testes baseados na detecção de material genético do parasita (BRASIL, 2017).

O diagnóstico parasitológico das leishmanioses é a pesquisa direta de formas amastigotas em diferentes tipos de amostras (Chulay e Bryceson,1983; Alves-Martin, 2017; Narvajas *et al*., 2019), esta técnica é considerada "padrão-ouro" devido a sua alta especificidade (BRASIL, 2017). Observação de formas amastigotas no interior de células fagocitárias por meio do esfregaço sanguíneo

ou observação de formas livres, após rompimento das células (Giudice e Passantino, 2011). Quando se investiga LT, a pesquisa direta pode ser realizada por meio de raspado da borda da lesão, biópsia com impressão do fragmento cutâneo em lâmina ou punção aspirativa da lesão. Já para LV, o exame é realizado em amostras de punção hepática, esplênica, de medula óssea, aspirados de linfonodos ou sangue periférico (WHO, 2010; BRASIL, 2017).

O teste de Intradermorreação de Montenegro avalia a resposta tardia de hipersensibilidade celular e representa o principal exame complementar para o diagnóstico da LT (Weigle *et al*., 1991). Dentre as principais desvantagens dessa técnica estão: o uso de cultura para produção do antígeno, as diversas preparações de antígenos influenciando na sensibilidade do teste, e o fato de não poder distinguir infecções presentes de passadas (Gontijo e Carvalho, 2003).

Quanto aos exames sorológicos, existem vários métodos descritos com sensibilidade e especificidade diagnósticas bastante variáveis (BRASIL, 2014). Os testes empregados são baseados na detecção de uma resposta humoral específica.

O ensaio imunocromatográfico (TR) é um teste qualitativo que permite a detecção rápida de anticorpos para *Leishmania* spp. com antígenos recombinantes rK39. Esse método é utilizado para a suspeita de LV. Atualmente no Brasil estão disponíveis diversos kits para humanos e para cães, o TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos) que é um teste de triagem, seguido do confirmatório imunoenzimático (ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay) (Dietze, 2006; Burza; Croft; Boelaert, 2018).

O teste ELISA consiste na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasma de cães com antígenos recombinantes ou purificados com glicoproteínas de membrana gp63, pg72, gp70 e rK39 específicas do gênero *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Porém, reações cruzadas com outros tripanossomatídeos ainda podem ocorrer (Alves; Bevilacqua, 2004).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é a técnica para diagnóstico humano para LV, em LT é controverso seu uso, pois não foram

validados em infecções assintomáticas podendo apresentar reações cruzadas. Além disso, é de baixo custo, rapidez e requer um microscópio de fluorescência. Essa técnica consiste em diluições seriadas em lâminas fixadas com antígenos, as formas promastigotas de *Leishmania* (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017).

A cultura *in vitro* é um método mais demorado e requer bastante experiência. Permite identificar *Leishmania* spp. na forma de promastigotas. As culturas são realizadas em diferentes tipos de meios. Geralmente utiliza-se um meio bifásio como o NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) e BAB (Blood Ágar Base) e na parte líquída, o LIT (liver infusion tryptose), Schneider, 199 e BHI (Brain Heart Infusion). O meio NNN é o mais empregado com a utilização do meio líquido LIT ou de Schneider que aumenta e acelera a positividade da cultura (Dietze, 2006; BRASIL, 2014). Já o BAB usa-se com o BHI com adição de urina humana estéril ou soro fetal bovino como suplemento proteíco (Schuster, Sullivan, 2002). É a única técnica que permite isolar formas infectantes do parasito (Gradoni e Gramiccia, 2008; Paixão-Marques *et al*., 2019).

Outro método clássico utilizado na identificação de *Leishmania*, são as análises de perfis eletroforéticos de isoenzimas e reações de detecção de antígenos do parasito com anticorpos monoclonais. Esses métodos baseiam-se na expressão fenotípica das diferentes espécies, e geram perfis informativos a respeito da identidade dos organismos (Cupolillo *et al*., 1994).

A partir da década de 80, as técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas e métodos de hibridização com sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucléicos, incluindo a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), para detecção de DNA tornaram-se disponíveis para identificação do parasito (Gontijo; Melo, 2004). A evolução da técnica de PCR e o advento da PCR quantitativa ou em tempo real (qPCR), entre outras variantes, possibilitou uma ferramenta valiosa na detecção, quantificação e tipagem de alvos de DNA (Kaltenboeck; Wang, 2005; Quaresma *et al*., 2009).

A técnica de Reação em Cadeia Polimerase (PCR) permite identificar e

ampliar quantidade suficiente de DNA do parasito de uma sequência de interesse com mais especificidade e sensibilidade (Alves; Bevilacqua, 2004). Especialmente para os casos de leishmaniose tegumentar, devido o amplo espectro que a doença se apresenta e ao fato que suas características podem sem confundidas com outras infecções (fungos, hanseníase, estreptococos e outros) (Veja-Lopez, 2003).

A reação da PCR acontece em cadeia, pois as fitas de DNA das regiões específicas que recentemente foram amplificadas, servirão como molde para os demais ciclos (Bianco; Mafra; Paiva, 2015). Contudo, o ensaio depende dos reagentes e equipamento para que a reação ocorra, tais como: termociclador, material biológico, *primer*s, dNTPs, $MgCl_2$, tampão e *Taq polymerase* (Novais; Pires-Alves, 2004; Agne *et al*., 2009; Santos *et al*., 2014). Sua aplicação pode elucidar casos suspeitos e duvidosos de Leishmaniose, além de contribuir em casos de infecções permanentes em cães tratados que apresentaram cura clínica, indicando se esses animais são positivos ou não (Pereira da Fonseca; Villa de Brito, 2008).

Para a amplificação dos fragmentos de DNA de *Leishmania* spp., podem ser utilizados diversos tipos de amostras biológicas (sangue total, cultura, camada leucocitária, aspirados de linfonodos e medula óssea, biópsia de pele e pelos), (Alvar *et al*., 2004; Gontijo; Melo, 2004) provenientes de humanos, cães, flebotomíneos, animais silvestres (Souza *et al*., 2010; Pita-Pereira *et al*., 2011; Rolim *et al*., 2016; Hossain *et al*., 2017).

Existem várias sequências alvos e protocolos para a PCR, sendo que os mais utilizados são: DNA do minicírculo do cinetoplasto (kDNA), as proteínas de choque térmico (70Dka heat shock proteins – hsp70), região de espaçadores transcritos internos (internal transcribed spacers - ITS), subunidade do RNA ribossomal (SSUrRNA), gene da glicose-6-fosfato desidrogenase (g6pd), entre outros (Bacha *et al*., 2011; Akhound, 2017)

É consenso entre os pesquisadores, que o uso de oligonucleotídeos iniciadores baseados na amplificação da região conservada do minicírculo (kDNA),

têm-se apresentado como método promissor e de crescente utilização. Além de ser mais sensível do que a região variável, apresentando de 10.000-20.000 cópias de DNA, aumentando a sensibilidade do ensaio (Nunes *et al*., 2007).

Mesmo sendo de grande sensibilidade, a PCR é um método mais utilizado em estudos epidemiológicos do que nos programas de controle da leishmaniose (Gomes *et al*., 2007). Além da capacidade de detectar fragmentos do DNA do parasito, a material biológico não precisa necessariamente estar íntegra (Lucheis *et al*., 2005). Outra vantagem é a aplicabilidade na identificação da espécie envolvida na transmissão da doença, podendo auxiliar no prognóstico, tratamento e epidemiologia da doença (Reithinger; Dujardin, 2007).

Para visualização do produto amplificado da PCR convencional (cPCR), é necessária a realização da eletroforese em gel de agarose, onde os fragmentos de DNA são separados de acordo com a carga e tamanho. O gel pode ser corado com brometo de etídeo, uma substância tóxica, porém existem corantes menos tóxicos (SYBR™ Safe, GelRed®, GelGreen® Nancy-520 entre outros) (Bianco; Mafra; Paiva, 2015; Hepp; Nonohay, 2016).

Além da técnica convencional (cPCR), temos em tempo real (qPCR) que possibilita a quantificação parasitária, ambas são altamente sensíveis e específicas e relativamente mais rápida quando comparado com técnicas parasitológicas e cultura de células (Reithinger; Dujardin, 2007; Faria; Andrade, 2012; Lindoso *et al*., 2016).

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) monitora, detecta e quantifica o DNA por fluorescência por meio de um termociclador com sistema óptico, onde os dados são analisados em um computador por um software. O sinal de fluorescência é gerado pelos *amplicons*, ou seja, pelo produto de amplificação do DNA, que aumenta na mesma medida que o produto da PCR (Bianco; Mafra; Paiva, 2015). A fluorescência pode ser gerada por dois principais reagentes, o SYBR que se liga a molécula de fita dupla e TaqMan, uma sonda com um fluoróforo em uma das extremidades e um quencher na outra. No decorrer da amplificação, o

equipamento capta a fluorescência e gera uma curva de amplificação (Arya *et al*., 2005).

A grande vantagem dessa técnica é a sua rapidez e automatização, pois o manuseio da amostra é menor, diminuindo o risco de contaminação (Galluzzi *et al*., 2018; Diotallevi *et al*., 2020). Com isso, na qPCR também é possível amplificar as sequências de DNA do parasita *Leishmania* para confirmação de diagnóstico (Martínez et. al., 2011).

A tecnologia de *High Resolution Melting* (HRM), é baseada na análise do perfil da temperatura de anelamento de um produto específico da PCR em tempo real. As curvas de dissociação geradas, funcionam com assinaturas que detectam as mutações, polimorfismos e diferenças epigenéticas, devido as pequenas diferenças na composição do nucleotídeo (Zampieri *et al*., 2016). Em conjunto com outras técnicas, atua com bastante êxito em genotipagem de variantes conhecidas e também na varredura de variantes desconhecidas (Reed; Kent; Witter, 2007).

Metodologicamente, na reação de HRM é adicionado antes da PCR um fluoróforo, um corante fluorescente que se intercala na dupla fita de DNA. Após a amplificação do fragmento específico, devido à grande quantidade de DNA fita dupla ocorre o maior grau de fluorescência. Deste modo, o termociclador executa a análise de HRM, ou seja, a amostra é aquecida gradativamente (aproximadamente de 70º - 90ºC) afim de dissociar a dupla fita de DNA, ao mesmo tempo em que a fluorescência é continuamente coletada. Esse processo gera uma curva de decaimento da fluorescência que é captada pelo leitor do equipamento, gerando curvas padrões (curvas de *melting*) de acordo com os diferentes genótipos. Conforme a temperatura aumenta, a fluorescência diminui, refletindo a ocorrência de desnaturação do DNA em fita simples (Corbett, 2006; White; Potts, 2006).

A partir da curva de dissociação, obtém-se a Tm da amostra, o ponto em que a temperatura de cada molécula de DNA, está 50% desnaturada (Reed *et*

al., 2007). Para a análise do HRM, são consideradas as diferenças entre as curvas de dissociação e diferença entre os valore de Tm das amostras (Graham *et al*., 2005). E para esse processo, não é necessário nenhum procedimento manual pós-PCR, pois sua realização ocorre em um sistema de tubo fechado, de baixo custo quando comparado a outros métodos para estudo de variações genéticas, além de ser uma técnica simples de alta sensibilidade e especificidade (Life Technologies Corporation, 2010; Vossen *et al*., 2009).

O desenvolvimento da técnica de HRM ocorreu devido ao progresso dos reagentes, instrumentos e os softwares. Com os novos reagentes, como os agentes intercalantes de DNA saturantes, foi possível aumentar a sensibilidade e detecção de moléculas variantes de DNA. Quando adicionados as reações de amplificações, além de não prejudicarem a performance das DNA polimerases, possuem alta afinidade com as moléculas de fita dupla (Reed; Kent; Wittwer, 2007). A dinâmica acontece devido ao fato da fluorescência ser proporcional ao número de ligações entre as fitas (Ruskova e Raclavsky, 2011).

Os agentes intercalantes saturantes SYBR® Green I e MeltDoctor ®/SYTO 9, são os mais utilizados na reação do HRM, juntamente com equipamentos com atualização óptica e térmica e softwares de análises rápidos para a aquisição de dados e controle térmico de alta precisão (Zampieri, 2019). Os equipamentos que monitoram o decaimento da fluorescência, como o ViiA 7, QuantStudio (Applied Biosystems) e Rotor-Gene 6000 (Corbett), possuem uma taxa de leitura a 0,017ºC/s (Moreira *et al*., 2017).

Alguns estudos, usam a metodologia de HRM para identificação de espécies de *Leishmania* para diferentes alvos. O gene codificador da proteína do choque térmico 70 (HSP70), provou ser útil para identificar espécies de origens geográficas diferentes e o gene haspb (*Hydrophilic Acylated Surface Protein* B gene) diferenciou cepas de *L.* (*L.*) *donovani* no leste da África (Graça *et al*., 2012; Zampieri *et al*., 2016).

Há pouco tempo, a análise por HRM em estudos clínicos

demonstraram o quão sensível é a técnica para detectar ínfimas alterações nas regiões de diversos genes. Desse modo, auxilia na identificação de mutações em genes e identificação molecular das espécies (Ashtiani *et al*., 2017; Edwards *et al*., 2018).

No estudo de Aghaei e colaboradores, foi possível identificar com a técnica de HRM infecção natural de *L. (L.) tropica* em uma espécie de vetor *Phlebotomus sergenti* (Aghaei *et al*., 2014). No mesmo ano, foram padronizados ensaios de HRM para região alvo ITS1 e o HSP70, quando comparados com as cepas referência, identificaram *L. (L.) infantum chagasi, L. (L.) amazonensis, L. (L) mexicana, L. (V.) panamensis, L. (V.) guyanensis e L. (V.) braziliensis* (Hernández *et al*., 2014).

Zampieri e colaboradores diferenciaram oito espécies de *Leishmania* encontradas nas Américas: *L. (L.) infantum, L. (L.) amazonensis, L. (L.) mexicana, L. (V.) lainsoni, L. (V.) braziliensis, L. (V.) guyanensis, L. (V.) naiffi e L. (V.) shawi*; e três espécies da Europa, Ásia e África: *L. (L.) tropica, L. (L.) donovani e L. (L.) major*. Nesse estudo, foi desenvolvido um ensaio para a região alvo do gene HSP70 da *Leishmania* (Zampieri *et al*., 2016).

Como já dito anteriormente, a metodologia da qPCR e HRM possuem alta sensibilidade e especificidade para detectar com êxito espécies de *Leishmania*, tornando-o útil em aplicações para diagnóstico pré tratamento da leishmaniose, especialmente quando se trata de amostras biológicas com carga parasitária baixa (Garcia *et al*., 2005; Cruz *et al*., 2002; Strauss-Ayali *et al*., 2004).

Diante dos fatos apresentados, ainda se faz necessário mais estudos moleculares a respeito das metodologias que detectam, quantificam e identificam espécies de *Leishmania* em diferentes tipos de amostras biológicas, assim como é necessário a complementação de técnicas diagnósticas parasitológicas e sorológicas, afim de que os dados clínicos epidemiológicos de casos suspeitos de LV possam ser adequados e avaliados. Ao considerar a diversidade de técnicas e metodologias hoje disponíveis para a identificação específica e mesmo de

subpopulações dos protozoários, seja para o esclarecimento de pontos obscuros na epidemiologia; rotas de disseminação; na patogenia; na melhoria do diagnóstico laboratorial; na prospecção de novas drogas ou alvos terapêuticos e, mesmo no prognóstico de evolução clínica, entre outros, sugere-se a avaliação da ocorrência de *Leishmanias* importantes em saúde pública em animais domésticos e silvestres do estado de São Paulo.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Caracterização molecular de *Leishmania* spp., utilizando diferentes técnicas diagnósticas em cães domésticos e silvestres do estado de São Paulo.

2.2 Objetivos específicos

- Cultivar e isolar formas amastigostas de *Leishmania* spp a partir de materiais biológicos de cães domésticos.
- Pesquisar *Leishmania* spp. em diferentes materiais biológicos por meio das análises de PCR.
- Diferenciar as espécies de *Leishmania* amplificadas nas análises de PCR utilizando *primers* específicos para a região HSP70.

Material e Métodos

3. Material e métodos

3.1. Aspectos éticos

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (Nº10/2014) e pelo Conselho Técnico Científico do Instituto (CTC) do Adolfo Lutz de São Paulo (Nº36K/2018).

3.2. Material biológico

3.2.1. Animais Silvestres

Foram analisados nove (09) biópsia de lesão e dois (02) aspirado de fígado e baço, totalizando 11 amostras, a partir de onze animais silvestres de três espécies diferentes, coletados no munícipio de Ilhabela no período de 2001 a 2005. O material biológico e as espécies utilizadas estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Material biológico de animais silvestres para diagnóstico de *Leishmania* spp.

Nome científico	Nome popular	Sexo	Material biológico	Identificação das amostras	Nº animais
Proechimys iheringi	Rato-de-espinho	M	Biópsia da lesão	1; 30; 45; 130	4
Proechimys iheringi	Rato-de-espinho	F	Biópsia da lesão	29; 43; 44	3
Proechimys iheringi	Rato-de-espinho	NI	Biópsia da lesão	2	1
Philander opossum	Cuíca-de-quatro-olhos	M	Biópsia da lesão	129	1
Didelphis albiventris	Gambá-de-orelha-preta	NI	Aspirado de fígado e baço	140; 141	2
Total					**11**

NI: Não informado

3.2.2. Cães

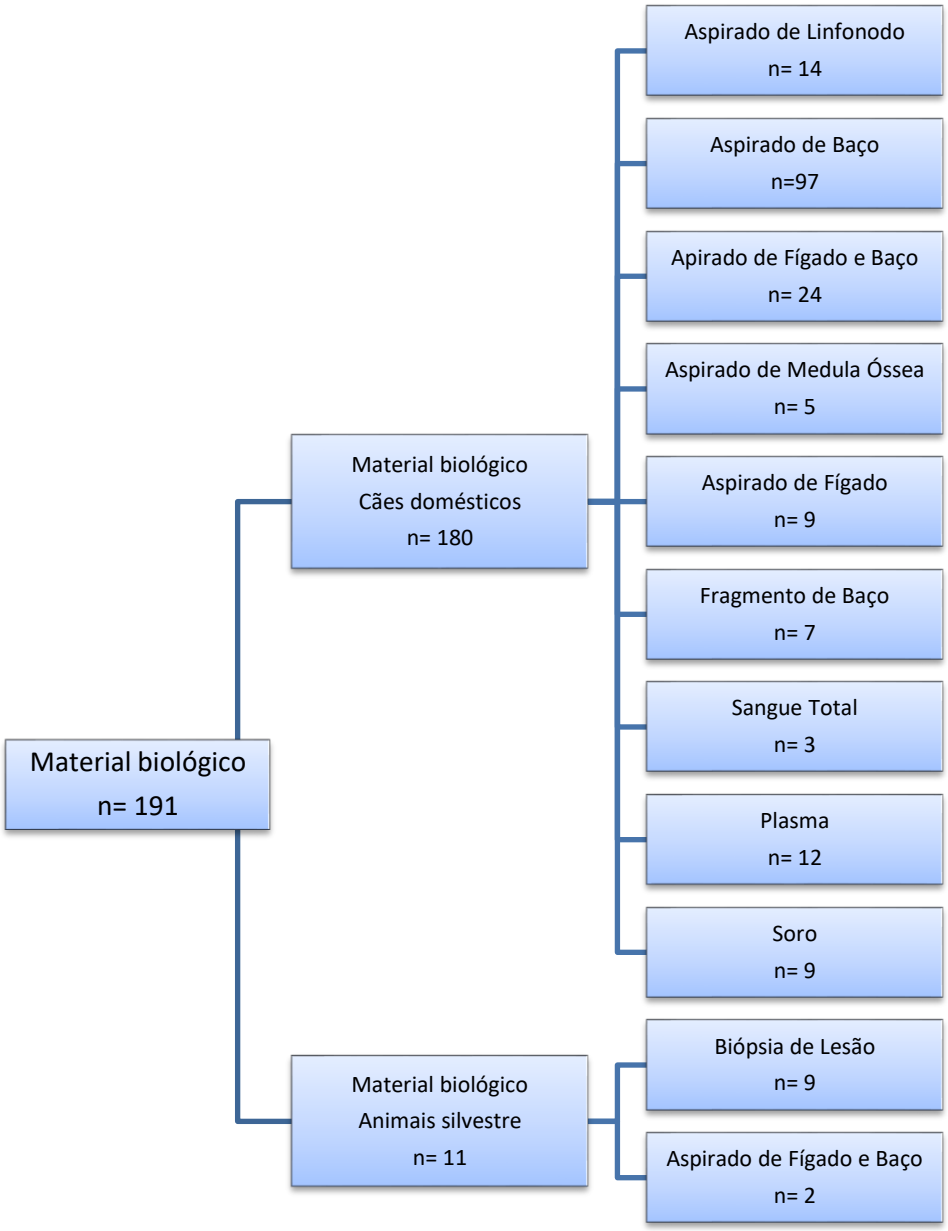
Foram analisados um total de 180 amostras de material biológico coletados a partir de 162 cães, procedentes de dez diferentes municípios do Estado de São Paulo. O tipo de material biológico utilizado está descrito na tabela 2.

Tabela 2. Material biológico de cães domésticos com suas respectivas localidade e ano de coleta.

Municípios	Material biológico	Ano	Nº amostras	Nº animais
Andradina	Aspirado de baço	2002	5	5
Araçatuba	Fragmento de baço	2002-05	2	122
	Fragmento de fígado		4	
	Aspirado de baço		92	
	Aspirado de fígado e baço		24	
Bauru	Aspirado de linfonodo	2019-20	14	14
	Plasma		3	
	Aspirado de medula óssea		5	
	Fragmento de fígado		5	
	Fragmento de baço		5	
Dracena	Plasma	2018	4	4
Fernandópolis	Soro	2019-20	2	2
Guaimbê	Soro	2019	2	2
Junqueirópolis	Plasma	2018	3	3
Presidente Prudente	Plasma	2018	5	5
São José Rio Preto	Soro	2020	3	3
Votuporanga	Soro	2020	2	2
Total			**180**	**162**

O organograma das amostras deste estudo, está representado na figura 6.

Figura 6- Organograma das amostras do estudo.



3.2.3. Local de estudo e procedência dos animais

O desenvolvimento da pesquisa incluiu amostras de diferentes municípios do Estado de São Paulo (Figura 7). Os envios das amostras ocorreram por meio dos centros laboratoriais de Presidente Prudente, Araçatuba, Marília, São José do Rio Preto e Bauru. A escolha dos municípios foi feita pela intensidade de

transmissão humana e canina da LVA. E também devido a quase todos os municípios apresentarem autoctonia de transmissão de LVA humana e ou canina, além de registrarem autoctonia de transmissão da LTA.

Figura 7- Mapa do Estado de São Paulo e os respectivos municípios envolvidos na pesquisa.

3.2.4. Coleta das amostras silvestres

Em relação as amostras de animais silvestres, as mesmas foram coletadas anteriormente para outros estudos e estavam armazenadas no Instituto Adolfo Lutz Bauru a -70° C até o momento de sua utilização.

A captura desses animais, foi realizada pela equipe de campo do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. As armadilhas utilizadas foram gaiolas de grade de arame galvanizado dobráveis, com bananas servindo de iscas. Em todas as localidades de captura as armadilhas foram dispostas em áreas florestadas distantes 200m da residência. Suas dimensões: 30,0 cm x 20,0 cm x 20,0 cm,

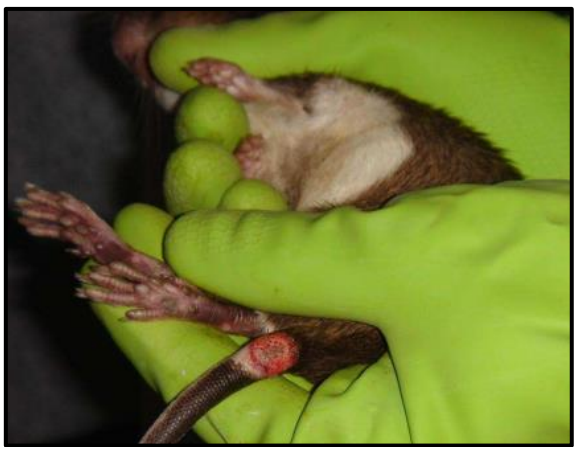
permitiram a captura dos animais vivos (Figura 8).

Figura 8- Armadilha de arame galvanizado para captura de animais silvestres.

Fonte: Tese Helena Hilomi Taniguchi.

A coleta das amostras foi realizada no mesmo local onde os animais foram capturados. Foi realizada a biópsia das lesões em base da cauda ou das manchas hipocrômicas em cauda (Figura 9 e 10) e posteriormente semeadas no meio de cultura.

Figura 9- Lesão base de cauda de *Proechimys iheringi.*



Fonte: Tese Helena Hilomi Taniguchi.

Figura 10- Manchas hipocrômicas na cauda *Proechimys iheringi.*

Fonte: Tese Helena Hilomi Taniguchi.

3.2.5. Coleta das amostras caninas

Todos os cães do presente estudo foram recolhidos pelo CCZ de seu respectivo município e foram diagnosticados com leishmaniose visceral e/ou apresentavam clínica compatível com a doença. Para diagnóstico sorológico foi realizado o teste imunocromatográfico rápido - TR-DPP® (Dual Path Plataform, Biomanguinhos, Brasil), seguido do teste confirmatório imunoenzimático – ELISA (Biomanguinhos, Brasil).

Os responsáveis pelas coletas das amostras caninas em cada município, está disposto na tabela 3.

Tabela 3. Coletas de material biológico caninas realizados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ).

Município	Responsável
Andradina	Equipe de campo -IAL-SP
Araçatuba	Equipe de campo -IAL-SP
Bauru	Pesquisadora Helena Hilomi Tanigushi
Dracena	
Fernandópolis	
Guaimbê	Veterinária Camila Monteiro da Silva
Junqueirópolis	
Marília	Veterinária Camila Monteiro da Silva
Presidente Prudente	Veterinário João Henrique Artero de Carvalho
São José Rio Preto	NI

No município de Bauru, Marília, Presidente Prudente e SJRP foram coletados cerca de 2 à 5mL de sangue por punção venosa periférica dos cães em tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e mantidos sob refrigeração uma alíquota em tubos sem anticoagulante para obtenção de soro.

Realizou-se também no município de Bauru a punção aspirativa dos linfonodos e medula óssea em 14 cães (Tabela 4), utilizando-se agulha fina descartável em movimentos regulares de avanço e recuo ao interior do órgão (Figura 11). As amostras foram semeadas no meio de cultura Liver Infusion Tryptose (LIT) + Mc Neal, Novy & Nicolle (NNN).

Figura 11- Punção aspirativa em cães domésticos no CCZ de Bauru.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 4. Coletas de material biológico de cães domésticos realizados no CCZ de Bauru para cultivo em cultura.

Animal	Material biológico	Nº de amostras
C 1 C 2 C 3	Aspirado de linfonodo	3
C 4	Aspirado de linfonodo; Aspirado de medula óssea; Fragmento de fígado; Fragmento de baço; Sangue total.	5
C 5	Aspirado de linfonodo; Aspirado de medula óssea; Fragmento de fígado; Fragmento de baço; Sangue total.	5
C 6	Aspirado de linfonodo; Aspirado de medula óssea; Fragmento de fígado; Fragmento de baço; Sangue total.	5
C 7	Aspirado de linfonodo; Aspirado de medula óssea; Fragmento de fígado; Fragmento de baço.	4
C 8	Aspirado de linfonodo; Aspirado de medula óssea; Fragmento de fígado; Fragmento de baço.	4
C 9, C 10, C 11, C 12 C 13, C 14	Aspirado de linfonodo	6
Total		**32**

As amostras biológicas de Araçatuba, Andradina e Ilhabela foram coletadas anteriormente para outro estudo e estavam armazenadas sob refrigeração a -70°C até o momento de sua utilização.

3.3. Análise sorológica

3.3.1. TR-DDP

O TR foi realizado em todas as amostras caninas em cada município responsável pela coleta, a partir do inquérito sorológico. Exceto as amostras

caninas de Araçatuba e Andradina, que foram realizadas seu diagnóstico pela equipe de campo do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

3.3.2. ELISA

Foram analisadas um total de 25 amostras de soro e plasma canina coletadas entre o período de 2018 a 2020 no município de Bauru. As demais amostras já haviam sido confirmadas.

O ELISA consiste na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasma de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like* obtidos a partir de cultura *in vitro* (ANEXO 1).

3.4. Isolamento

Em capela de fluxo laminar, limpa com álcool 70° e mantida sob a ação de luz ultravioleta (UV) foram separados um tubo para cada amostra, contendo, 5mL de meio LIT+ NNN (ANEXO 2, 3 e 4).

As amostras foram semeadas e mantidas em estufa a 25°C, até quatro meses após a inoculação.

3.4.1. Leituras

Após sete dias da inoculação da amostra no meio, foi realizada a primeira leitura. Em capela de fluxo laminar, pipetou-se 10 µL de cada tubo entre lâmina e lamínula, após leve homogeneização. As culturas foram observadas quinzenalmente, sob microscopia óptica no aumento de 1000X, com óleo de imersão durante três meses (ANEXO 5). As culturas que apresentaram formas sugestivas de promastigotas, foram consideradas positivas e submetidas ao preparo para a extração do DNA de *Leishmania* spp. imediatamente.

3.4.2. Preparo das culturas para extração de DNA

Todas as culturas contendo amostras de sangue total (plasma, camada leucocitária e sedimento de hemácias) punção de linfonodo, aspirado de M.O,

fragmento de fígado e fragmento de baço, foram preparadas para extração de DNA. As culturas foram lavadas com Solução Salina Tamponada (PBS) estéril, pH 7,4, centrifugadas a 1000 RPM por 10 minutos e o pellet armazenado em microtubos estéreis livres de DNAses e RNAses a -20° C para extração do DNA posteriormente (ANEXO 6).

3.5. Análise molecular

3.5.1 Preparo das culturas

Foram cedidas cepas provenientes de culturas de *Leishmania* mantidas em cultivo no meio NNN + LIT (Novy, MacNeal, Nicolle e Liver Infusion Tryptose) do LASAB/APTA/SAA-SP Bauru. A contagem para o cálculo da concentração de parasitos por microlitro, foi realizada utilizando-se câmara de Neubauer. Deste modo, estabeleceu-se uma concentração decrescente de 10^5 a 1 parasito/mL para a extração de DNA (ANEXO 8).

3.5.2 Extração DNA

A extração do DNA de todas as amostras foi realizada com o Kit comercial Illustra Blood GenomicPrep (GE Healthcare®) de acordo com as recomendações do fabricante (ANEXO 7) (Figura 12). Após extração, o DNA de cada amostra foi armazenado em microtubos de 1,5mL no freezer à -20ºC.

Figura 12- Kit illustra™ blood genomicPrep Mini Spin (GE Healthcare).

Fonte: Arquivo pessoal.

3.5.3. Quantificação DNA

A quantificação do DNA (ng/µL) foi realizada para estimar a pureza do DNA na amostra pela relação de absorbância 260/280 e também para quantificar a quantidade total de DNA. Todas as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro Epoch™ (BioTek, USA) (Figura 13) utilizando-se a placa multi-volume Take3™, que permite analisar até 16 amostras (ANEXO 9 e APÊNDICE 1).

Figura 13- Espectrofotômetro Epoch™ (BioTek, USA).

Fonte: Arquivo pessoal.

3.6. Diluição de *primers*

Os *primers* foram diluídos adicionando-se 10 vezes a quantidade de nanomoles de água ultrapura no *primer* liofilizado, estabelecendo-se uma solução estoque de 100 µM. Após, diluiu-se a solução estoque em microtubos de 0,6 mL, realizando diluições 1:10 (10 µL solução estoque + 90 µL de água ultrapura) para solução uso.

3.7. Reação em cadeira da polimerase convencional – cPCR

As reações ocorreram sob as seguintes condições: 1,3µL de tampão de PCR (50mM KCl, 20mM de Tris-HCl pH 78 8,4), 0,4µL de $MgCl_2$ (1,6 µM), 0,25µL de dNTPs (0,2µM), 0,25µL (1U) de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen®), 0,25µL (0,2µM) de cada *primer*, 2µL de DNA extraído da amostra e 8,3µL de água ultrapura. Deste modo, cada microtubo de 0,2mL apresentou 11 µL de MIX- PCR e

2 µL do produto de extração de DNA. A incubação foi realizada no termociclador de gradiente Veriti ™ 96-Well Thermal Cycler" (Life Technologies, Carlsbad, USA).

Foi realizada à amplificação do gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) em todas amostras deste estudo, como controle interno e para avaliar a integridade do DNA extraído. A amplificação foi realizada com os *primers* GAPDH4R (5' -ATT AAG TTG GGG CAG GGA CT- 3') e GAPDH4F (5'-AGG CTG AGA ACG GGA AAC TT- 3'), de acordo com Edvinsson (2006) e algumas alterações: um ciclo inicial de 95°C por 50 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 30 segundos, anelamento à 60°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 30 segundos, seguindo uma extensão final à 72°C por 5 minutos.

A sequência alvo para as análises das amostras foi a região do minicírculo kDNA que amplificam 720pb. De acordo com Aransay e colaboradores (2000), a amplificação do kDNA foi realizada em todas as amostras com os iniciadores LINR4 (5'-GGG GTT GGT GTA AAA TAG GG -3') e LIN19 (5'-CAG AAC GCC CCT ACC CG-3'), e incubadas a 94°C por 5 min, seguido por 40 ciclos, cada um consistindo de 30 s a 94°C, 30 s a 58°C, e 1 min a 72°C, e uma extensão final a 72°C por 10 min.

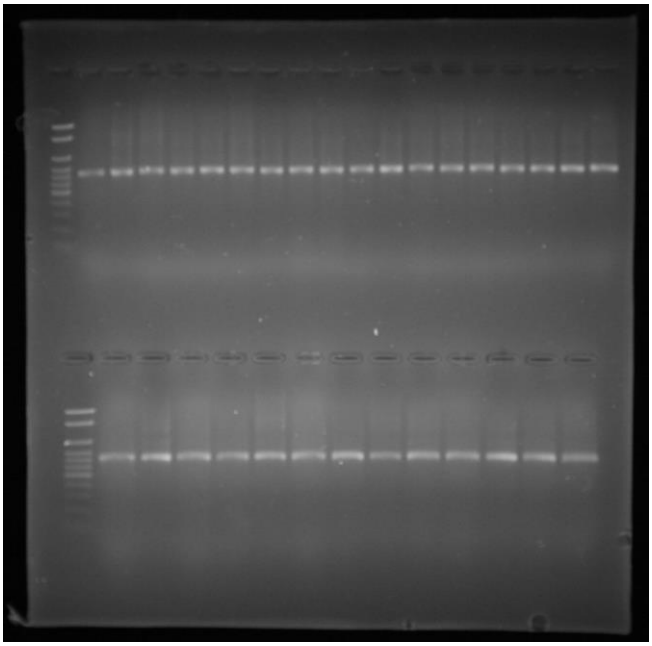
Os controles positivos utilizados foram cepas de DNA de referência *L. infantum* (MHOM/BZ/1982) e *L. major* (MHOM/BZ/1982) da Coleção de *Leishmania*s do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC FIOCRUZ) e como controle negativo foi utilizado água estéril ultrapura (Invitrogen).

3.7.1. Visualização do material amplificado

A visualização do material amplificado foi avaliada pela corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% adicionado de 0,1 µL /mL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). Foram adicionados 8 µL do material amplificado com 2 µL do tampão de corrida (0,25% azul de bromophenol, 0,25% xileno cianol, 30% glicerol, 70% água Milli-Q) e os tamanhos dos fragmentos foram estimados por

comparação com marcadores de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (Norgen) (Figura 14). A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal contendo TBE 1X ((0,1M Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA) com voltagem empregada de 100V por 60 minutos. Após o término da corrida o gel foi visualizado em transluminador de luz Syngene® (DigiGenius, USA), sob luz ultravioleta (296nm) e a imagem capturada pelo sistema de documentação digital pelo software EOS utility® (Canon, USA).

Figura 14- Amostras caninas amplificadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.



Fonte: Arquivo pessoal

3.8. Reação em cadeira da polimerase em tempo real - qPCR

As reações de qPCR foram padronizadas com o sistema SYBR® Green com o reagente Power SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems® by Thermo Fisher Scientific) no StepOne™ Plus Real Time PCR System (Life Technologies®, Carlsbad, USA) (Figura 15). A sequência alvo utilizada foi a proteína de choque térmico de 70 kDa (hsp70), HSP70F (5' AGG TGA AGG CGA CGA ACG 3') e HSP70R (5' CGC TTG TCC ATC TTT GCT TC 3'), adaptado a partir de Hernández *et*

al. (2014). As condições do ciclo de PCR em tempo real foram ajustadas, e cada amostra foi realizada em duplicata. A quantidade de DNA presente nas amostras foi expressa em relação à curva padrão de cada ensaio.

Figura 15- Termociclador StepOne™ Plus Real Time PCR System (Life Technologies, USA).

Fonte: Arquivo pessoal.

3.8.1. Padronização das reações de qPCR

Foram testadas diferentes combinações de concentrações de iniciadores *Forward* e *Reverse* para o alvo HSP70 (Tabela 5). As reações foram executadas utilizando 10 µL do Master Mix em um volume final de reação de 25 µL. O perfil de ciclagem utilizado foi adaptado a partir de Hérnandez e colaboradores (2014): 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15s, 62°C por 1 minuto e uma etapa para a curva de dissociação de 95°C por 15s, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15s.

Tabela 5. Protocolo de teste de eficiência, com concentrações diferentes dos *primers forward* e *reverse* utilizado na qPCR para o alvo HSP70.

		Primer forward							
		200 nM	250 nM	300 nM	400 nM	500 nM	600 nM	700 nM	800 Nm
Primer reverse	200 nM	Reação 1		Reação 9	Reação 10	Reação 11	Reação 12		
	250 nM		Reação 2						
	300 nM	Reação 13		Reação 3	Reação 14	Reação 15	Reação 16		
	400 nM	Reação 17		Reação 18	Reação 4	Reação 19	Reação 20		
	500 nM	Reação 21		Reação 22	Reação 23	Reação 5	Reação 24		
	600 nM	Reação 25		Reação 26	Reação 27	Reação 28	Reação 6		
	700 nM							Reação 7	
	800 nM								Reação 8

Além das concentrações, foram testadas três temperaturas de anelamento: 60°C, 61°C e 62°C. Todas as reações foram realizadas em placas de 96 poços MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate 0.1 mL (Applied Biosystems), utilizando o StepOne™ Plus Real Time PCR System (Life Technologies, USA), e o software utilizado para a análise dos resultados foi o programa StepOne™ Software v2.3. O protocolo utilizado para as reações de qPCR após a padronização está representado na tabela 6.

Tabela 6. Protocolo de qPCR utilizado para o alvo HSP70 com suas respectivas concentrações, reagentes e quantidades por amostra.

Reagente/ Concentração	Quantidade (1x)
Power SYBR® Green PCR master Mix	10 µL
Primer forward ([Estoque]=10 µM/ [Solução uso] =200 nM	0,5 µL
Primer reverse ([Estoque]=10 µM/ [Solução uso] =300 nM	0,75 µL
Água ultrapure	11,75 µL
Total volume: 23 µL Mix de reação + 2 µL DNA	**Volume total 25 µL**

3.8.2. Ensaios de linearidade da qPCR

Os ensaios de linearidade (curvas-padrão) para determinação do limite de detecção do alvo HSP70, foi realizado utilizando DNA extraído da cultura de *Leishmania*. Foi feito uma diluição seriada em 6 pontos, em duplicata, iniciando com uma concentração de 10^5 parasitos/mL até 10^0 parasitos/mL. Os gráficos de representação das curvas-padrão foram construídos com o programa StepOne™ Software v2.3..

3.8.3. Quantificação da carga parasitária de amostras caninas e animais silvestres

A obtenção dos valores da quantificação absoluta, foi realizada do mesmo modo que a curva padrão. Foi obtido o log da quantidade de *Leishmania* de cada amostra a partir da fórmula obtida da curva padrão utilizada: y=-3,44x+39,93. Sendo que "x" é o valor de Ct obtido e "y" o valor da quantidade de *Leishmania* em log (APÊNDICE 2).

3.9. HRM – *High Resolution Melting*

As reações de HRM foram padronizadas para o gene codificador de proteínas do choque térmico (heat shock proteins) HSP70 de *Leishmania* spp., de acordo com Graça *et al*. (2012), com adaptações de Zampieri *et al*. (2016). As amostras analisadas foram comparadas aos controles positivos, que são cepas

referência da coleção de *Leishmania* do Instituto Oswado Cruz – CLIOC.Cepas de *Leishmania infantum* (MCER/BR/1981/M6445); *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269). Como controle negativo, foi utilizado água ultrapura.

3.9.1. Pré-amplificação a partir de PCR convencional

Primeiramente foi realizada a pré amplificação a partir da cPCR para restringir a região de interesse. O fragmento específico do DNA da *Leishmania* com 380 pares de base (bp), que amplifica o gene codificador de proteínas do choque térmico (heat shock proteins). Os *primers* utilizados foram HSP70 Preamp.F (5'GGCATCCTGAACGTGTCCG3') e HSP70 Preamp.R (5'ATCTTGGTCATGATCGGGTTGCAT3'). As condições da reação ocorreram no Termociclador Veriti ™ 96-Well Thermal Cycler"(Life Technologies, Carlsbad, USA) e foram: desnaturação inicial de 94 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s, 72 °C por 30 segundos, um ciclo final de 72°C por 10 minutos, e 8 °C após fim da reação (Graça *et al*., 2012). O protocolo de amplificação está descrito na tabela 7.

Tabela 7. Protocolo de pré amplificação utilizado para o alvo HSP70.

Reagentes	Quantidade (1x)
Buffer	2,6 µL
$MgCl_2$	0,8 µL
Dntp	0,5 µL
Primer F	0,05 µL
Primer R	0,05 µL
Taq	0,5 µL
H_2O	18,5 µL
DNA	2 µL
Total volume: 23 µL Mix + 2 µL DNA (10 ng)	**25 µL**

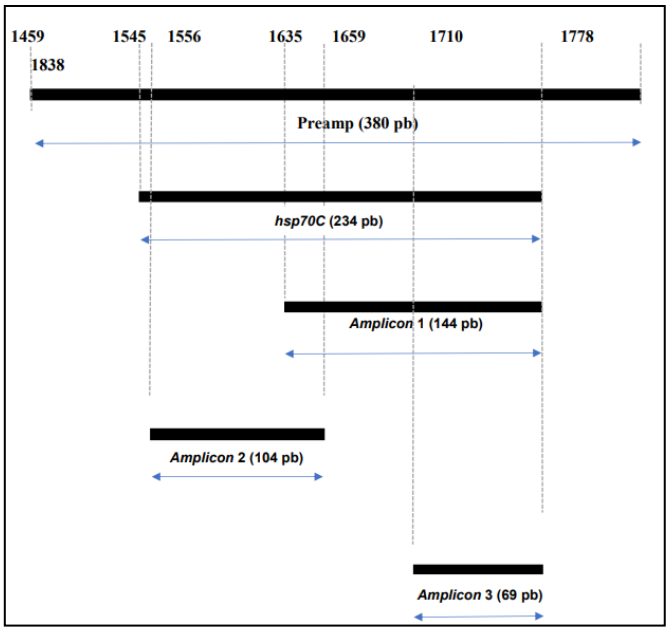
3.9.2. Análise de dissociação pela curva de Melting

Os *primers* utilizados nas análises de HRM, sequência e o respectivo tamanho de cada *amplicon*, foram demonstrados na tabela 8. E sua localização no gene HSP70 e seus respectivos pares de bases na figura 16.

Tabela 8. *Primers* utilizados na análise de HRM, desenhados para a região alvo da proteína de choque térmico HSP70.

Primers	**Tamanho do *amplicon***	**Sequência**
Amplicon 1 hsp70F2 hsp70C anti-sense	144 pb	5'GGAGAACTACGCGTACTCGATGAAG3' 5'TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG3'
Amplicon 2 hsp70F1 hsp70R1	104 pb	5'AGCGCATGGTGAACGTGCGTC3' 5'CTTCA TCGAGTACGCGTAGTTCTCC3'

Figura 16- Mapa de localização dos *amplicons* no gene hsp70 utilizados nesse trabalho.



. Fonte: Zampieri, 2019.

As reações de qPCR seguida por HRM, foram realizadas utilizando o MeltDoctor™ HRM Master Mix (Applied Biosystems®, Life Technologies, USA), com o fluoróforo MeltDoctor™ HRM Dye/SYTO 9 (Life Technologies) em um volume

final de 20 µL com 0,2 µM de cada *primer*. A quantidade padronizada dos reagentes está demonstrada na Tabela 9.

Tabela 9. Protocolo de reagente utilizado no preparo da reação de HRM.

Reagentes	Quantidade (1x)
MeltDoctor Mix	10 µL
H_2O	3,8 µL
Primer F	0,6 µL
Primer R	0,6 µL
DNA (ng/ µL)	5 µL
Volume total: 15 µL Mix + 5 µL DNA (10 ng)	**20 µL**

O preparo do mix, foi realizado na capela de fluxo e distribuído 15 µl na placa de 96 poços de 0,1 mL (MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate 0.1 mL – Applied Biosystemns/Life Technologies). Logo após, foram acrescentados 5 µl de DNA em cada poço. As condições para amplificação em tempo real e análise de melting foram: ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos e anelamento/extensão a 60ºC por 30 segundos, com captura dos sinais de fluorescência no final de cada fase de extensão, seguido por uma curva de dissociação para a análise de HRM no Termociclador StepOne™ Plus Real Time PCR System (Life Technologies, USA). A HRM foi visualizada e analisada no Software v.3.0.1 (Life Technologies, USA), que compara e emparelha o perfil da amostra com o controle e seleciona o padrão com o valor mais próximo (Zampieri *et al*., 2016).

3.10. Sequenciamento

As amostras positivas para *Leishmania* spp. que não foram possíveis a determinação da espécie e as amostras não identificadas no HRM foram purificadas com a enzima ExoSap (USB), sendo utilizado 4µL da enzima para cada 10µL de produto da PCR, incubando incialmente durante 1 hora a 37°C e depois

por 20 minutos a 80°C, e posteriormente quantificado em espectrofotômetro (Epock- Biotek) (ANEXO 10). As amostras foram sequenciadas pelo método Sanger, como serviço de terceiros no Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, São Paulo, Brasil.

As sequências *sense* e *antisense* obtidas foram visualizadas (software Chromas 2.3) na forma de eletroferograma, alinhadas utilizando-se o programa Clustal pelo Software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 10.0 para Windows (KUMAR *et al*., 2018), submetidas ao BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e comparadas com as sequências depositadas nos bancos de dados.

Resultados

4. Resultados

4.1. Provas sorológicas

4.1.2. ELISA

O ensaio enzimático confirmatório (ELISA), foi realizado em todas as amostras caninas de soro e plasma, totalizando 24 amostras (Tabela 10). As demais amostras do estudo já haviam sidas confirmadas no TR e ELISA. Todas as amostras analisadas foram reagentes no teste confirmatório ELISA.

Tabela 10. Amostras caninas analisadas pelo ensaio Imunoenzimático ELISA, com diagnóstico reagente para *Leishmania* spp. e suas respectivas localidades.

Municípios	Material biológico	Nº Amostras
Bauru	Plasma	3
Dracena	Plasma	4
Fernandópolis	Soro	2
Guaimbê	Soro	2
Junqueirópolis	Plasma	3
Presidente Prudente	Plasma	5
São José Rio Preto	Soro	3
Votuporanga	Soro	2
Total		**24**

4.2. Cultura

Na leitura das culturas, uma (1/14 (7,1%)) amostra de aspirado de linfonodo do cão C14 (assintomático) apresentou formas sugestivas de promastigotas de *Leishmania* spp. (Tabela 11). Nas demais, não foram visualizadas ao longo dos quatro meses de leitura.

Tabela 11. Amostras caninas cultivadas no meio LIT+NNN, que apresentaram formas sugestivas de promastigotas de *Leishmania* spp.

Municípios	Amostras biológicas	Amostras positivas
Bauru	Aspirado de linfonodo	1 /14
	Sangue total	0 /3
	Aspirado de medula óssea	0 /5
	Fragmento de fígado	0 /5
	Fragmento de baço	0 /5
Total		**1**

4.3. Provas moleculares

Todas as amostras do estudo foram submetidas a extração de DNA, inclusive as amostras com resultado negativo na cultura de *Leishmania*. Posteriormente foi realizada a quantificação de DNA de todas as amostras.

4.3.1. Quantificação de DNA

Na quantificação de DNA, ao analisar o grau de pureza das amostras, 53/191 (27,7%), apresentaram relação de absorbância 260/280 entre 1,8 e 2,0, 81/191 (42,4%) apresentaram valores acima de 2,0, enquanto as demais 57/191 (29,8%) amostras apresentaram valores abaixo de 1,8 (APÊNDICE 1).

4.3.2. PCR convencional (cPCR)

4.3.2.1. Análise da integridade do DNA

Ao analisar a integridade do DNA extraído com *primers* que amplificam uma região conservada do gene GAPDH de vertebrados, 85/159 (53,5%) amostras amplificaram, as demais 74/159 (46,5%) foram negativas (Tabela 12).

Tabela 12. Relação de amostras positivas e negativas na análise de cPCR para o *primer* GAPDH, em amostras de cães domésticos e animais silvestres.

Animal	Material biológico	Positivas	%	Negativas	%
Canis familiaris	Aspirado de Baço	44	44,3%	54	55,7%
	Aspirado de Fígado e Baço	16	66,7%	8	33,3%
	Aspirado de Linfonodo	NR	NR	NR	NR
	Aspirado de Medula Óssea	NR	NR	NR	NR
	Fragmento de Fígado	4	100%	0	0
	Fragmento de Baço	2	100%	0	0
	Plasma	12	100%	0	0
	Soro	3	33,3%	6	66,7%
Proechimys iheringi	Biópsia da lesão	4	44,4%	5	55,6%
Philander opossum	Biópsia da lesão	0	0	0	0
Didelphis albiventris	Aspirado de Fígado e Baço	1	50%	1	50%
Total		**85**	**53,5%**	**74**	**46,5%**

4.3.2.1. cPCR com *primers* LINR4/LIN19

A análise de cPCR com os *primers* LINR4/LIN19, que amplificam a região do minicírculo kDNA, foi realizada em todas as amostras. A amplificação de DNA do parasito *Leishmania* foi observada em 151/191 (79,1%) amostras. Nas demais amostras, 40/191 (20,9%) não apresentaram amplificação de DNA no gel de agarose. Dentre as amostras negativas na cPCR, foram confirmadas a negatividade das 31 amostras que não foram observadas formas sugestivas de promastigotas de *Leishmania* na cultura. O resultado das amplificações está descrito na Tabela 13.

Tabela 13. Relação da análise de cPCR para *Leishmania* spp., utilizando os primers LINR4/LIN19 em amostras caninas e animais silvestres.

Material biológico	Positivas	%	Negativas	%
Aspirado de Baço	94	96,9%	3	3,1%
Aspirado de Fígado e Baço	26	100%	0	0
Aspirado de Linfonodo	1	7,1%	13*	92,9%
Aspirado de Medula Óssea	0	0	5*	100%
Fragmento de Fígado	4	44,4%	5*	55,6%
Fragmento de Baço	2	28,6%	5*	71,4%
Biópsia da lesão	9	100%	0	0
Plasma	12	80%	3*	20%
Soro	3	33,3%	6	66,7%
Total	**151**	**79**	**40**	**21**

*Amostras de cultura negativa.

Todas as amostras analisadas procedentes de animais silvestres amplificaram. (Tabela 14).

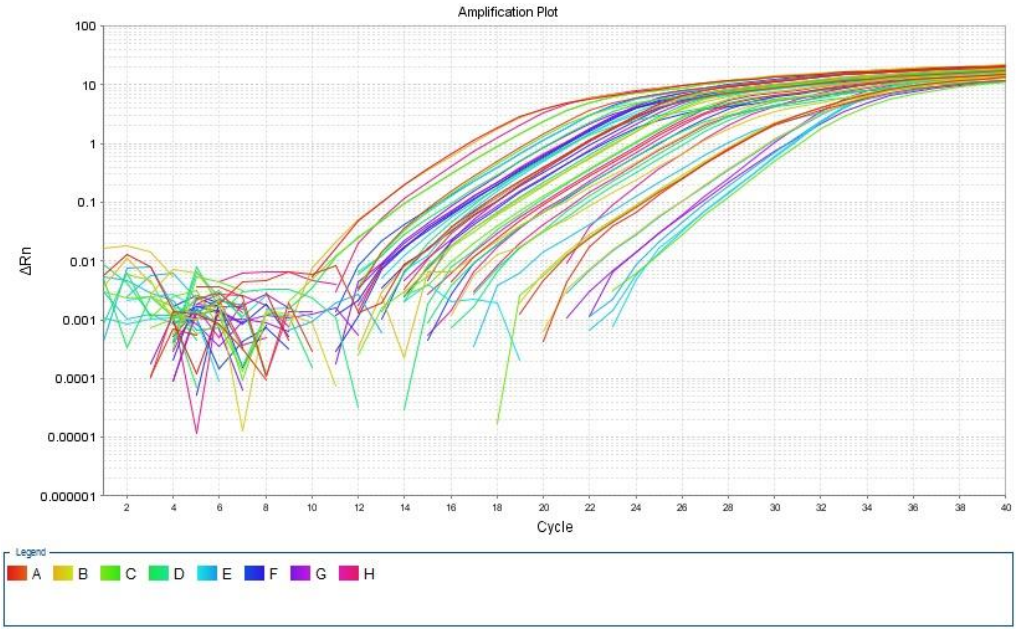
Tabela 14. Relação da análise de cPCR para *Leishmania* spp., utilizando os primers LINR4/LIN19 em amostras caninas e animais silvestres, por localidade e espécie de animal.

Municípios	Animal	Material biológico	Nº Amostras
Andradina	*Canis familiaris*	Aspirado de Baço	5/5
Araçatuba		Aspirado de Baço	89/92
		Aspirado de Fígado e Baço	24/24
		Fragmento de Fígado	4/4
		Fragmento de Baço	2/2
Bauru		Aspirado de Linfonodo	1/14
Dracena		Plasma	4/4
Fernandópolis		Soro	2/2
Ilhabela	*Proechimys iheringi*	Biópsia da lesão	8/8
	Philander opossum	Biópsia da lesão	1/1
	Didelphis albiventris	Aspirado de Fígado e Baço	2/2
Junqueirópolis	*Canis familiaris*	Plasma	3/3
Presidente Prudente		Plasma	5/5
SJRP		Soro	1/3
Total			**151**

4.3.3. PCR em tempo real

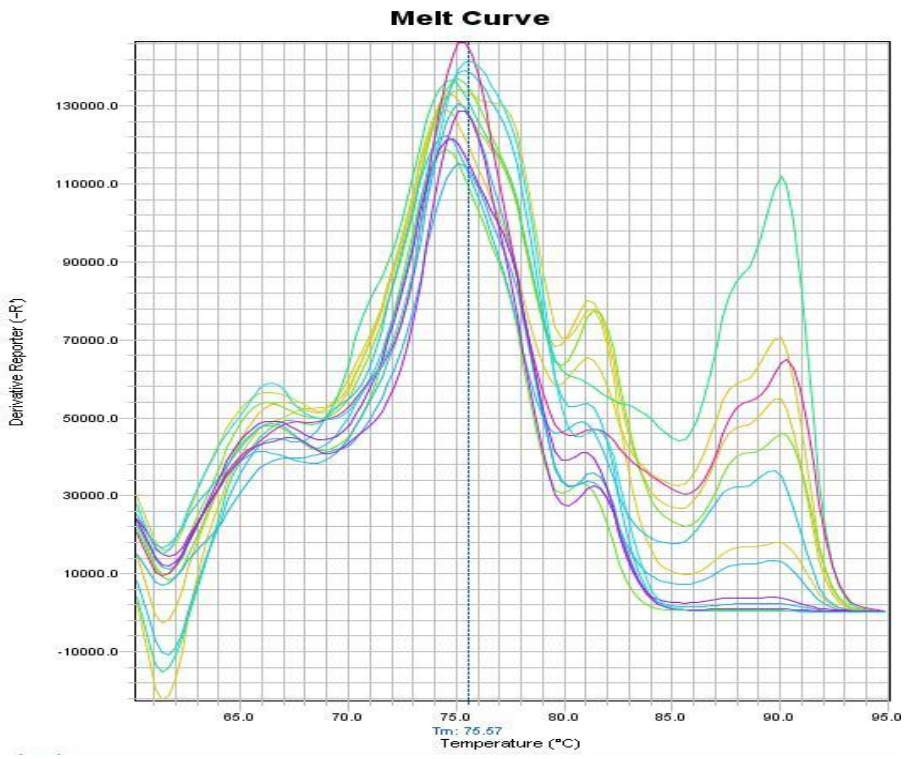
As reações de qPCR para a região alvo da proteína de choque térmico de 70kDa da *Leishmania* foi realizada nas 151 amostras que amplificaram na cPCR. A amplificação do DNA de *Leishmania* spp., ocorreu em 72/151 (47,6%) amostras. Sendo nove amostras (81,8%) procedentes de animais silvestres e 63 amostras (35%) de cães domésticos. A figura 17 ilustra a amplificação de 28 amostras caninas e quatro de animais silvestres. Nas demais amostras caninas (79) e silvestres (2), não foi observado amplificação de DNA do parasito (Figura 18).

Figura 17- Curva de amplificação de DNA de *Leishmania* spp. em diferentes materiais biológicos de cães domésticos e animais silvestres.



Não houve amplificação de DNA no grupo controle negativo da reação, a Melt Curve indicou apenas formação de dímeros de *primers* (Figura 18). De acordo com o protocolo do fabricante, os dímeros de *primers* são mais prevalentes em amostras negativas e amostras com baixa concentração de DNA do parasito.

Figura 18- Curva melting do grupo controle negativo e amostras negativas.



4.3.3.1. Quantificação de DNA a partir da qPCR

A partir da curva-padrão, foi possível quantificar a presença do DNA de *Leishmania* spp. em todas as amostras avaliadas (Figura 19-A e 19-B). A quantificação de DNA nos parasitos encontrados nas amostras avaliadas, variou entre $1x10^{-2}$ e $2,7x10^{8}$ parasitos/mL.

Figura 19.A- Curva-padrão de amplificação de DNA de *Leishmania* spp., obtidas com PCR em tempo real baseado em SYBR Green.

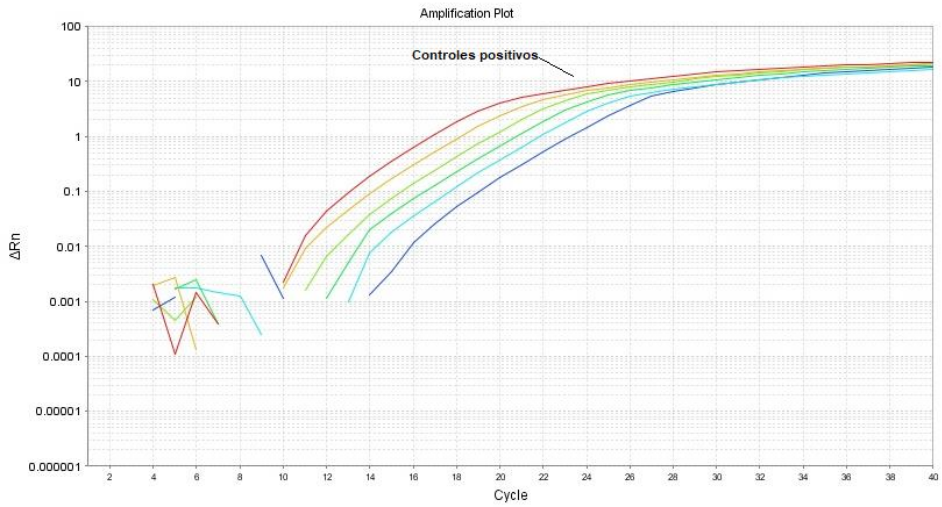
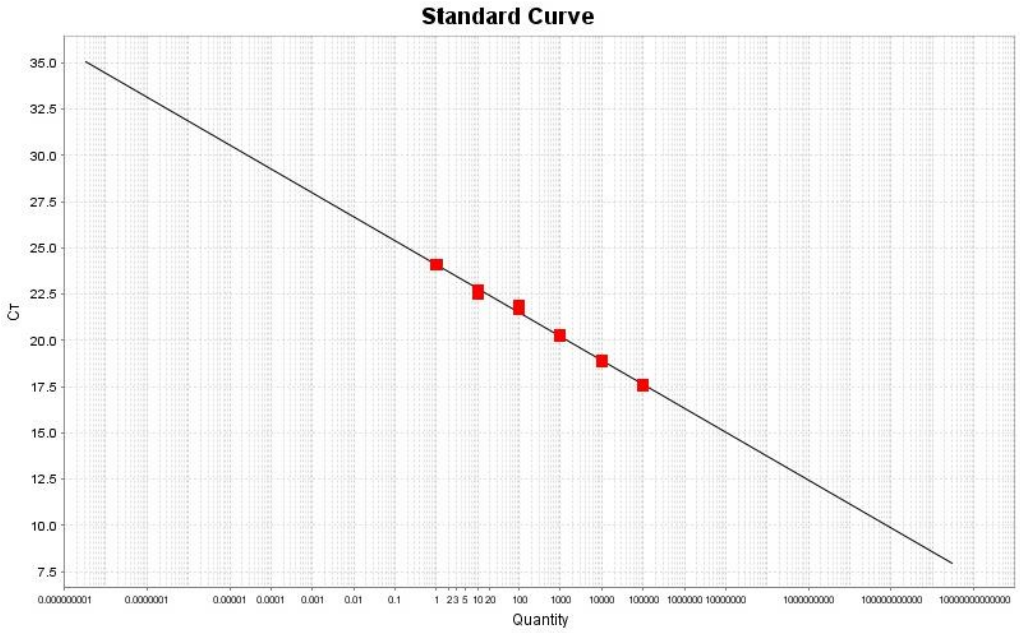


Figura 19.B- Curva-padrão de amplificação de DNA de *Leishmania* spp., obtidas com PCR em tempo real baseado em SYBR Green.



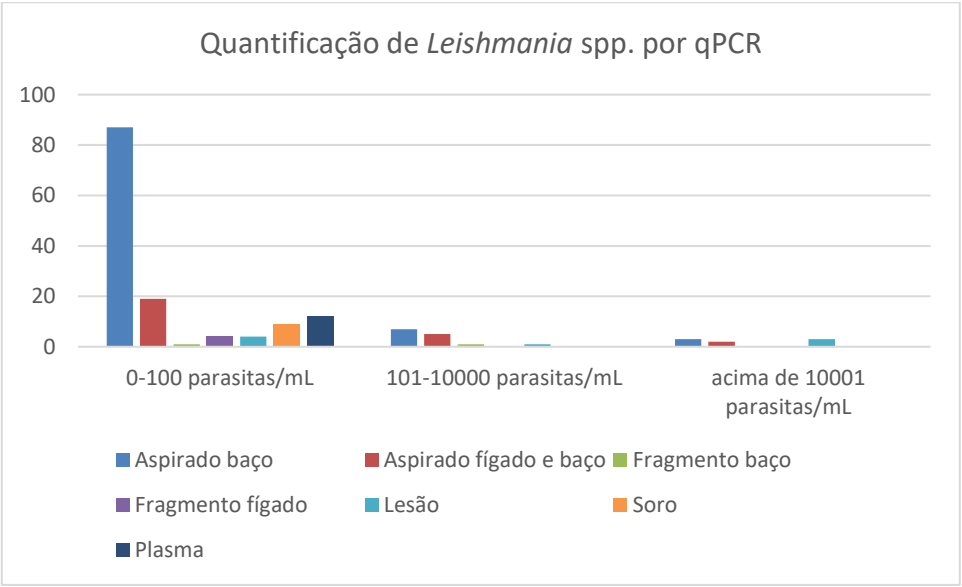
Os respectivos CTs e cargas parasitárias das amplificações de todas as

amostras analisadas, estão descritas no APÊNDICE 2.

As amostras positivas, apresentaram amplificações com CTs entre 13,20 e 27,78. Todas as amostras biológicas apresentaram amplificações na qPCR, exceto as amostras de soro.

As amostras biológicas de biópsia de lesão e aspirado de fígado e baço provenientes de animais silvestres, foram as que apresentaram os menores CTs, com variações entre 13,20 e 19,70, com quantificação de DNA entre $2,5x10^3$ e $2,7x10^8$ parasitos/mL. (Figura 20)

Figura 20- Quantificação da carga parasitária de *Leishmania* a partir da qPCR.

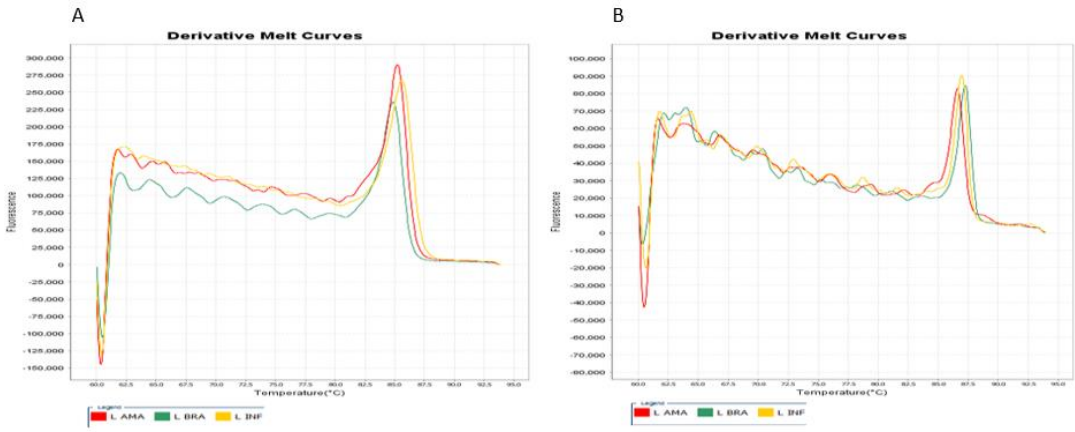


4.3.4. HRM

Na padronização da técnica do HRM foi realizada a avaliação das cepas controles, para uma análise eficaz e confiável, pois as amostras biológicas analisadas foram comparadas com as curvas padrões de cepas já identificadas. Em todas as reações, como já esperado foi observado apenas um pico na curva de Melting. (Figura 21).

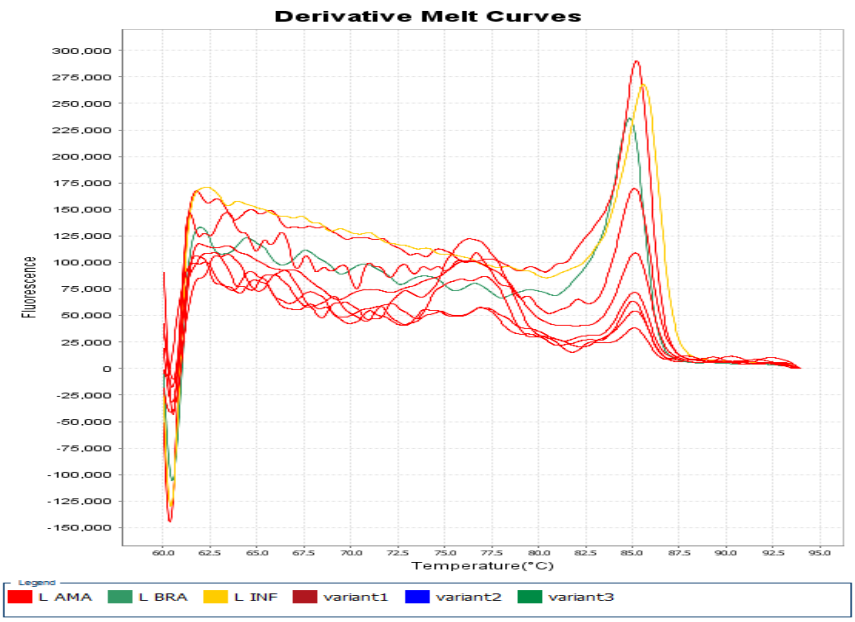
Figura 21- Padronização da curva de Melting com cepas padrão de DNA de *Leishmania* utilizando

os *primer*s HSP70. *Leishmania amazonensis* curva vermelha, *Leishmania infantum* curva amarela e *Leishmania braziliensis curva verde.* A e B: Formação de pico único na curva de Melting.



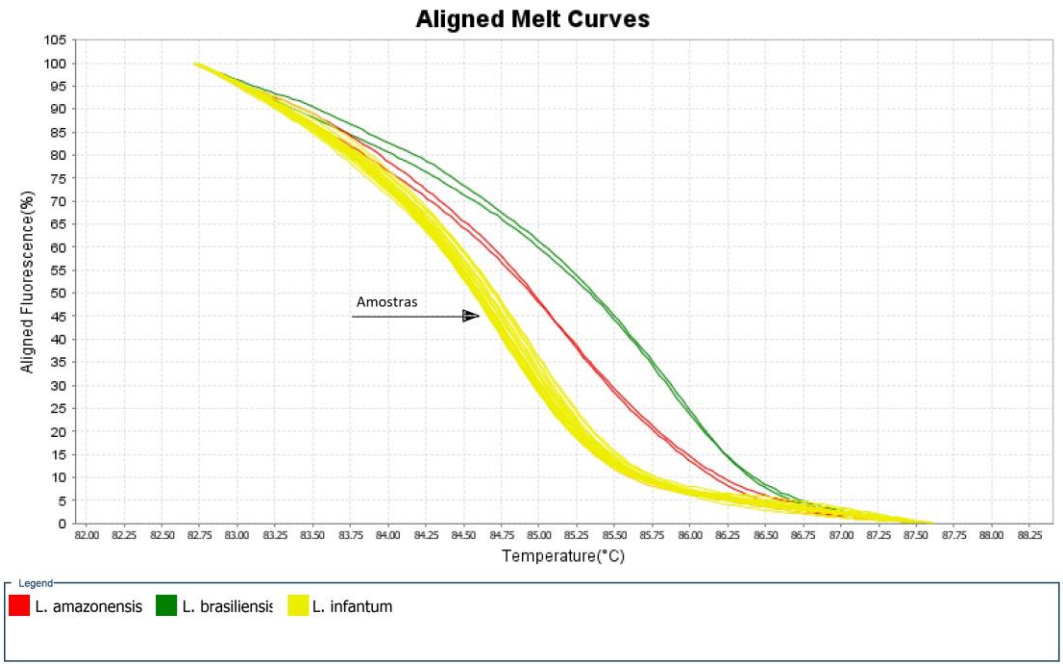
Algumas amostras pré amplificadas foram analisadas sem a diluição (1:10) (Figura 22). Desta forma, foi observado mais de um pico na curva de Melting. Por esse motivo, todas as amostras pré amplificadas foram diluídas posteriormente ao serem analisadas.

Figura 22- Padronização do ensaio HRM utilizando os *primer*s HSP70. Amostras biológicas analisadas sem diluição após a pré amplificação.



Com relação a identificação das espécies de *Leishmania* spp., o ensaio de HRM foi realizado nas 72 amostras positivas da qPCR. Destas, foi possível obter amplificações em 55/72 (76,4%) amostras, cujos perfis de dissociação foram compatíveis com os valores das cepas padrão de *Leishmania* (*L. infantum*; *L. braziliensis* e *L. amazonensis*) (Figura 23).

Figura 23- Ensaio de HRM (*amplicon* 1) – Curva melting das cepas padrão de *Leishmania*, amostras caninas e animais silvestres positivas, com temperaturas pré e pós melting de 83.3- 83.6 e 87.2- 87.5 respectivamente.



Os valores do índice de *Sillhouette Score* da maioria das amostras, encontraram-se entre 80 e 100, o que significa que não houve dispersão

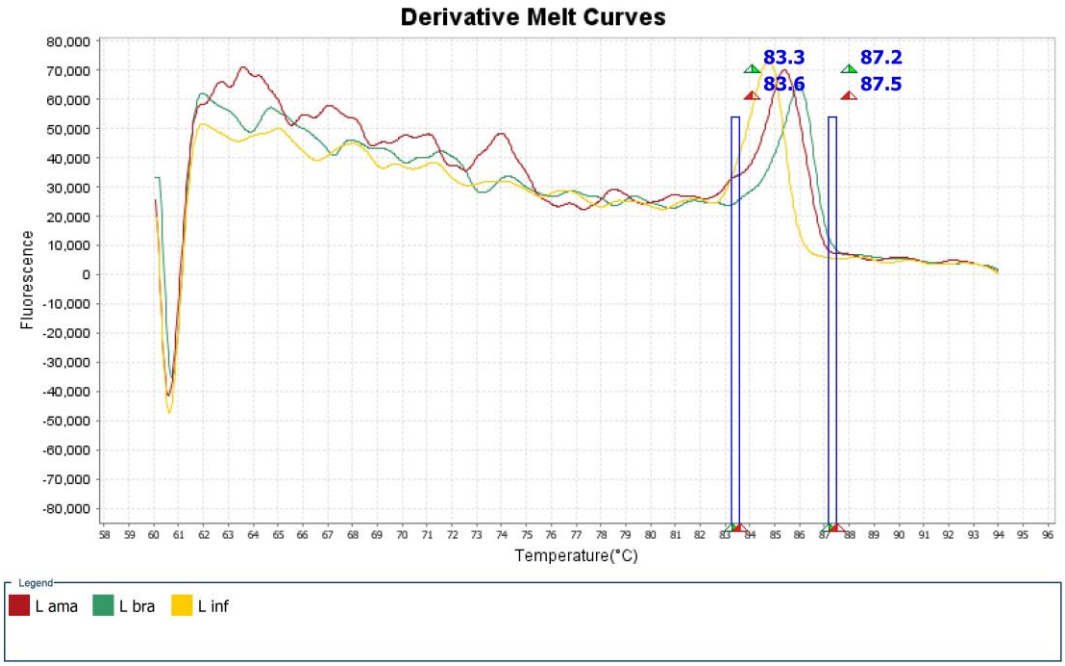
significante entre as curvas das espécies de *Leishmania*.

Na análise do HRM o *amplicon 1* (*primers* hsp70 F2 e hsp70C) foi o que apresentou os melhores resultados. O *Amplicon 1,* possui uma eficiência maior ao amplificar as espécies de *Leishmania,* e muito melhor quando se trata do subgênero *Leishmania*. O *Amplicon 2,* apresenta bons resultados no que diz repeito a *Leishmania* do subgênero *Viannia,* porém sua amplificação é menos evidente ou quase ausente.

Os valores obtidos dos CT (Cycle Threshold) após a qPCR encontraram-se entre 4 e 6 na maioria das amostras, sendo que algumas obtiveram CT entre 22 e 30. Já as cepas controles, apresentaram CT com valores entre 4 e 8.

A temperatura melting (Tm) foi ajustado para excluir possíveis ruídos da análise. Quanto mais próximas possíveis, numa diferença de no máximo 3ºC para que a análise possa ser bem detalhada e específica. Os valores pré-melting e pós-melting dos controles positivos foram definidos entre 83,3ºC/83,6ºC e 87,2ºC/87,5ºC respectivamente para comparação com as amostras analisadas (Figura 24).

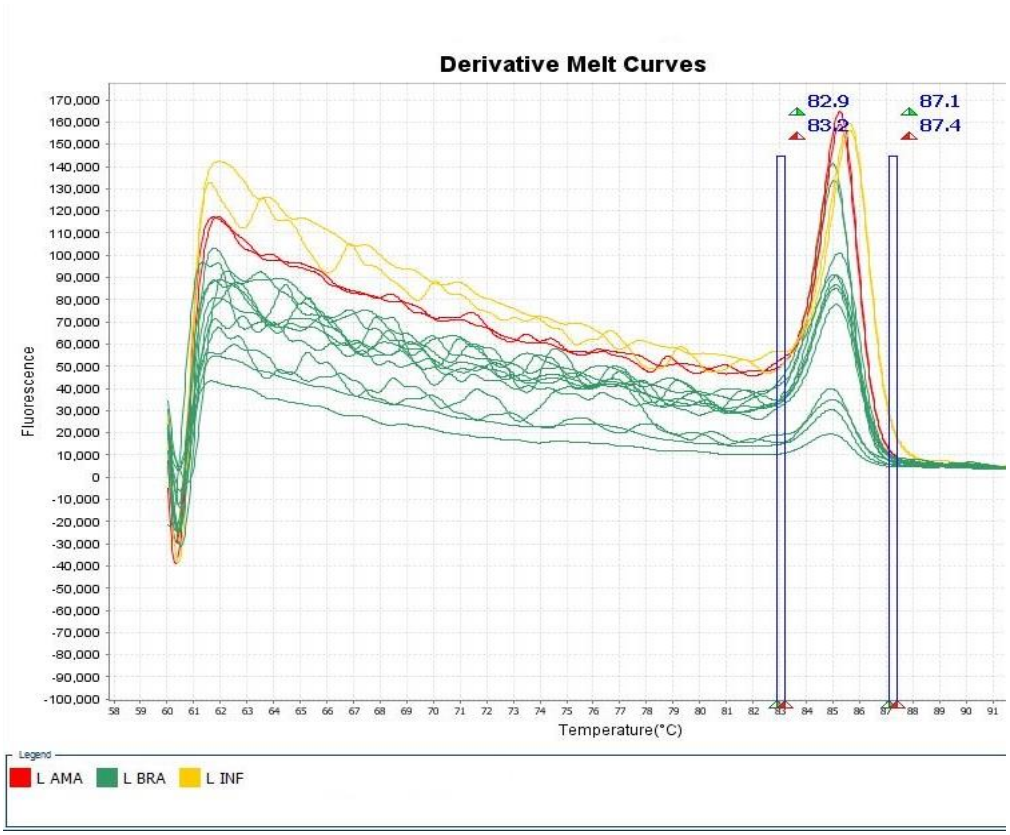
Figura 24- Ensaio de HRM (*amplicon* 1). Valores de temperatura pré-melting 83.3-83.6 e pós-melting 87.2-87.5 das cepas padrão de *Leishmania*.



Segundo os resultados obtidos para o *amplicon* 1 e *amplicon 2*, os valores da Tm na maioria das amostras apresentaram valores iguais ou bem semelhantes aos de *L. infantum.* Os valores de Tm de cada amostra analisada, está disposto no quadro 1.

Após a análise de HRM, 55/72 (76,4%) amostras analisadas foram identificadas como *L. infantum* e 7/55 (12,8%) ficaram entre *L. infantum* e *L. braziliensis* (Figura 25).

Figura 25- Ensaio de HRM (*amplicon* 1) - Cepas padrão de *Leishmania* e amostras positivas classificadas como *Leishmania braziliensis*.



Posteriormente, novas análises foram realizadas somente com as sete amostras que apresentaram resultados inconclusivos. Todas elas apresentaram valores iguais ou próximos as cepas controles de *L. infantum* (Figura 26 A e B) (Quadro 1).

Figura 26.A- Ensaio de HRM (*amplicon* 1) - Cepas padrão de *Leishmania* e repetição de amostras

positivas classificadas como *Leishmania infantum.*

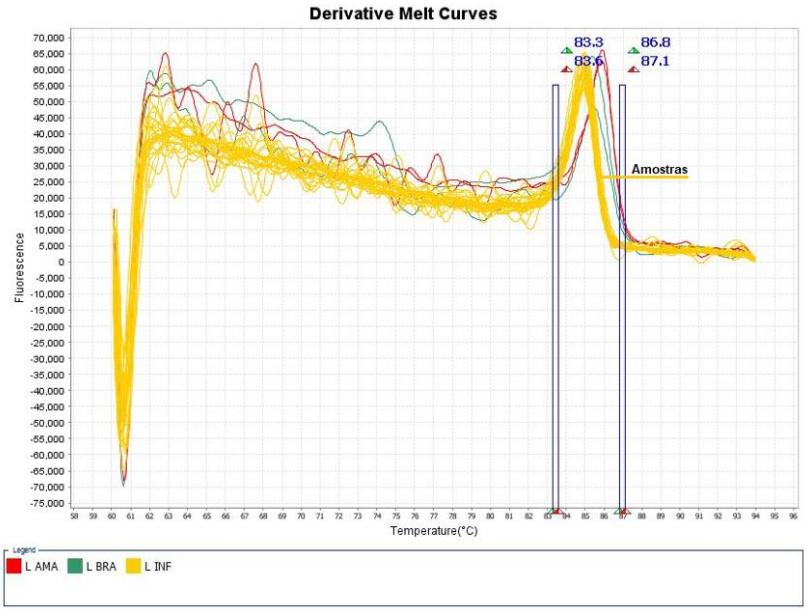
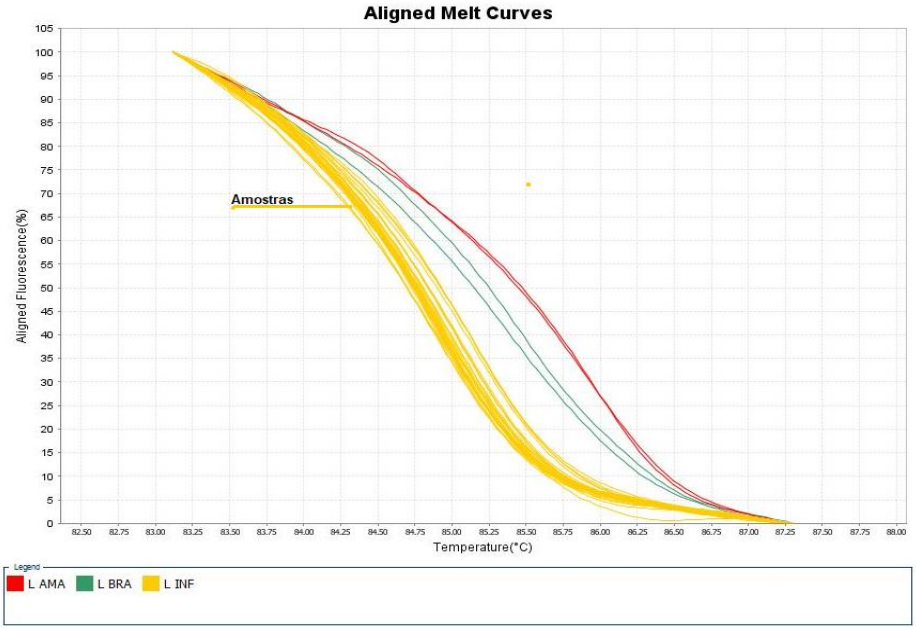


Figura 26.B- Ensaio de HRM (*amplicon* 1) - Cepas padrão de *Leishmania* e repetição de amostras positivas classificadas como *Leishmania infantum*



Quadro 1. Amostras de cães domésticos e animais silvestres, identificados na

análise de HRM com os respectivos valores de Tm (Tm1) compatíveis com as cepas padrão de *Leishmania*.

Amostra	Amplicon 1	Amplicon 2	Identificação
	Tm C°	Tm C°	
9	87,0	85,7	*Leishmania infantum*
101	87,0	85,7	*Leishmania infantum*
81	87,0	85,7	*Leishmania infantum*
97	87,0		*Leishmania infantum*
102	87,0	85,8	*Leishmania infantum*
8	87,0	85,7	*Leishmania infantum*
99	87,0	85,7	*Leishmania infantum*
96	87,0	85,3	*Leishmania infantum*
98	87,0	85,7	*Leishmania infantum*
100	87,0	85,7	*Leishmania infantum*
80	87,0	85,7	*Leishmania infantum*
3	87,0	85,8	*Leishmania infantum*
89	87,0	85,7	*Leishmania infantum*
90	87,0	85,7	*Leishmania infantum*
4	87,0	85,8	*Leishmania infantum*
103	86,9		*Leishmania infantum*
L. infantum	87,0	85,7	...
L. amazonensis	86,7	85,4	...
L braziliensis	86,9	85,2	...

Amostra	Amplicon 1	Amplicon 2	Identificação
	Tm C°	Tm C°	
83	84,8	85,1	*Leishmania infantum*
84	84,8	85,2	*Leishmania infantum*
86	84,9	85	*Leishmania infantum*
88	84,8	85,2	*Leishmania infantum*
85	84,7	84,8	*Leishmania infantum*
87	84,8	84,9	*Leishmania infantum*
49	84,8	84,8	*Leishmania infantum*
48	84,8	85	*Leishmania infantum*
47	84,8	84,9	*Leishmania infantum*
7	84,8	85	*Leishmania infantum*
2	84,8	85,2	*Leishmania infantum*
50	84,8		*Leishmania infantum*
45	84,7		*Leishmania infantum*
31	84,8		*Leishmania infantum*
33	84,7		*Leishmania infantum*
34	84,8	85	*Leishmania infantum*

32	84,9	84,9	*Leishmania infantum*
L. infantum	84,8	85,6	...
L. amazonensis	85,4	85,2	...
L braziliensis	85,9	85	...

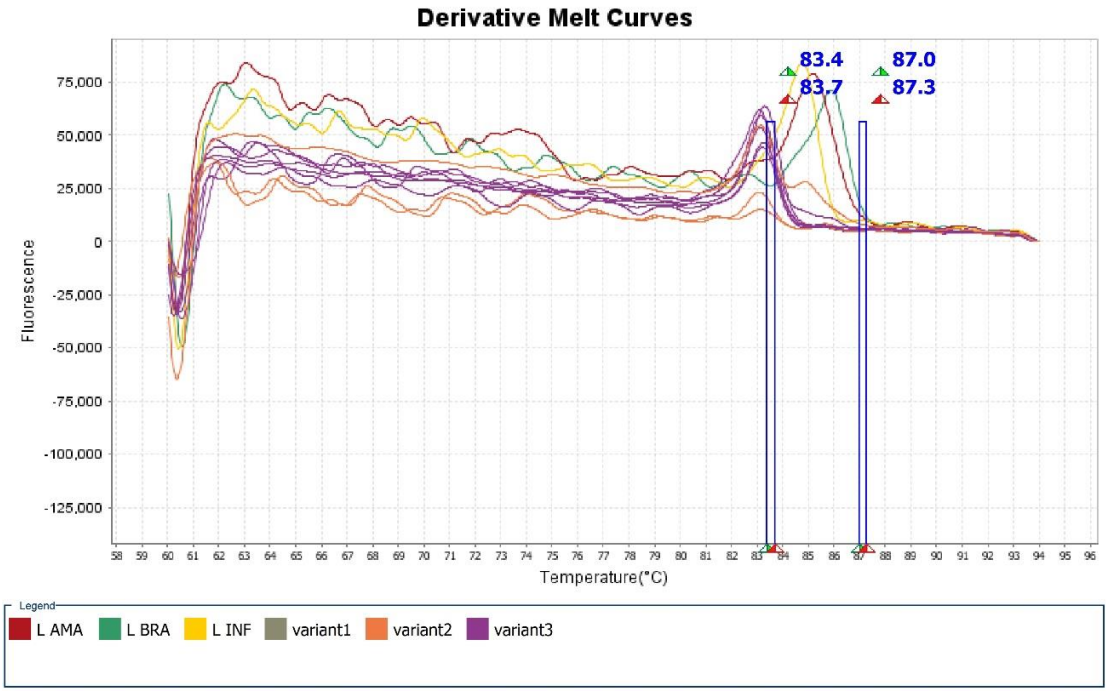
Amostra	**Amplicon 1**	**Amplicon 2**	**Identificação**
	Tm C°	**Tm C°**	
125	84,8	85,3	*Leishmania infantum*
116	84,8	85,4	*Leishmania infantum*
114	84,8		*Leishmania infantum*
121	84,8	85,2	*Leishmania infantum*
124	84,9	85,3	*Leishmania infantum*
117	84,8	85,3	*Leishmania infantum*
115	84,8		*Leishmania infantum*
118	84,8		*Leishmania infantum*
63	84,8		*Leishmania infantum*
68	84,8		*Leishmania infantum*
52	84,8		*Leishmania infantum*
123	84,8		*Leishmania infantum*
62	84,9		*Leishmania infantum*
122	84,7		*Leishmania infantum*
L. infantum	84,8	85,6	...
L. amazonensis	85,1	85,3	...
L braziliensis	61,3	84,9	...

Amostra	**Amplicon 1**	**Amplicon 2**	**Identificação**
	Tm C°	**Tm C°**	
150	84,8	85,3	*Leishmania infantum*
79	84,8	84,9	*Leishmania infantum*
70	84,9	85	*Leishmania infantum*
146	84,8	85,2	*Leishmania infantum*
147	84,7	85	*Leishmania infantum*
148	84,8	85,1	*Leishmania infantum*
56	84,7		*Leishmania infantum*
55	84,7		*Leishmania infantum*
L. infantum	84,8	85,6	...
L. amazonensis	85,2	85,3	...
L braziliensis	85,9	85	...

Dez amostras foram consideradas como “variante” pelo software, pois

não apresentaram Tm conforme as cepas padrão (Figura 27). E sete, ficaram sem identificação, pois não apresentaram valores de Tm parecidos com as cepas padrão nos dois *amplicons* analisados.

Figura 27- Amostras classificadas como "Variantes". Valores da Tm diferente das cepas controles.



A fim de obter um resultado conclusivo para essas amostras que não foram classificadas com nenhuma espécie das cepas padrão, as 17 amostras foram enviadas para o sequenciamento genético, porém não apresentaram nenhum resultado, devido à baixa concentração de DNA.

A tabela 15 apresenta os dados de todas as 55 amostras que apresentaram picos satisfatórios, e valores de Tm compatíveis com os valores exibidos para as cepas padrão de *Leishmania* (*L. infantum; L. braziliensis e L. amazonensis*) e sua identificação.

Tabela 15. Relação de todas as amostras de cães domésticos e animais silvestres, identificados na análise de HRM para *Leishmania infantum*, ultizando *primers* direcionados para a região HSP70.

N° amostra	Animal	Sexo	Município	Amostra	Necrópsia	Sinais clínicos	cPCR Lin19/R4	qPCR Quantificação	HRM
2	*Proechimys iheringi*	NR	Ilhabela	Lesão	NR	NR	Positivo	369.207,72	*L. infantum*
3	cão	NR	Araçatuba	Asp. Baço	NR	NR	Positivo	1.097.792,00	*L. infantum*
4	cão	NR	Araçatuba	Asp. Baço	NR	Caquexia	Positivo	304.235,94	*L. infantum*
7	cão	NR	Araçatuba	Asp. Baço	NR	Assintomático	Positivo	79,45	*L. infantum*
8	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	Esplenomegalia	Conjuntivite	Positivo	217,86	*L. infantum*
9	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	Esplenomegalia	Onicogrifose emagrecimento	Positivo	57,81	*L. infantum*
31	cão	NR	Araçatuba	Asp. FB	NR	NR	Positivo	0,42	*L. infantum*
32	cão	NR	Araçatuba	Fígado	NR	NR	Positivo	1,27	*L. infantum*
33	cão	NR	Araçatuba	Asp. FB	NR	NR	Positivo	1.143,98	*L. infantum*
34	cão	NR	Araçatuba	Baço	NR	NR	Positivo	614,57	*L. infantum*
45	*Proechimys iheringi*	Macho	Ilhabela	Lesão	NR	NR	Positivo	0,01	*L. infantum*
47	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	Esplenomegalia	NR	Positivo	0,30	*L. infantum*
48	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	Nada a registrar	Assintomático	Positivo	11,7	*L. infantum*
49	cão	Fêmea	Araçatuba	Asp. Baço	Esplenomegalia	Onicogrifose caquexia	Positivo	2.436,82	*L. infantum*
50	cão		Araçatuba	Asp. FB	NR	NR	Positivo	1,24	*L. infantum*
52	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	NR	Lesão na pata	Positivo	29,46	*L. infantum*

55	cão	NR	Araçatuba	Asp. Baço	NR	NR	Positivo	0,01	*L. infantum*
56	cão	NR	Araçatuba	Asp. Baço	NR	NR	Positivo	0,96	*L. infantum*
62	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	Esplenomegalia	Dermatite	Positivo	0,04	*L. infantum*
63	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	NR	NR	Positivo	44,74	*L. infantum*
68	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	Esplenomegalia	Dermatite	Positivo	54,15	*L. infantum*
70	cão	NR	Araçatuba	Asp. Baço	NR	NR	Positivo	0,03	*L. infantum*
79	cão	NR	Araçatuba	Asp. Baço	NR	NR	Positivo	0,18	*L. infantum*
80	cão	Fêmea	Araçatuba	Asp. Baço	NR	NR	Positivo	1.414,22	*L. infantum*
81	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	NR	Onicogrifose caquexia	Positivo	32,97	*L. infantum*
83	cão	Fêmea	Araçatuba	Asp. FB	Esplenomegalia	Alopecia, ascite	Positivo	757,67	*L. infantum*
84	cão	Macho	Araçatuba	Asp. FB	NR	Onicogrifose	Positivo	6.011,64	*L. infantum*
85	cão	Macho	Araçatuba	Asp. FB	NR	Alopecia onicogrifose	Positivo	0,06	*L. infantum*
86	cão	Fêmea	Araçatuba	Asp. FB	NR	Conjuntivite caquexia	Positivo	18,85	*L. infantum*
87	cão	Fêmea	Araçatuba	Asp. FB	Esplenomegalia	Emagrecimento linfonodo aumentado dermatite	Positivo	3,60	*L. infantum*
88	cão	Fêmea	Araçatuba	Asp. FB	NR	Conjuntivite dermatite linfonodo aumentado	Positivo	1.463,77	*L. infantum*

89	cão	Macho	Araçatuba	Asp. FB	Esplenomegalia	Dermatite onicogrifose	Positivo	258,10	*L. infantum*
90	cão	Macho	Araçatuba	Asp. FB	Esplenomegalia	Linfonodo aumentado	Positivo	98,62	*L. infantum*
96	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	NR	Onicogrifose	Positivo	3,01	*L. infantum*
97	cão	Fêmea	Araçatuba	Asp. Baço	NR	Conjuntivite	Positivo	0,23	*L. infantum*
98	cão	Fêmea	Araçatuba	Asp. Baço	NR	NR	Positivo	10,39	*L. infantum*
99	cão	NR	Araçatuba	Asp. Baço	NR	NR	Positivo	10,41	*L. infantum*
100	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	NR	Onicogrifose	Positivo	1.054,71	*L. infantum*
101	cão	Fêmea	Araçatuba	Asp. Baço	NR	Assintomático	Positivo	13,05	*L. infantum*
102	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	NR	Assintomático	Positivo	209,60	*L. infantum*
103	cão	Fêmea	Araçatuba	Asp. Baço	NR	NR	Positivo	55,72	*L. infantum*
114	cão	M	Araçatuba	Asp. Baço	NR	Onicogrifose caquexia	Positivo	13,01	*L. infantum*
115	cão	Fêmea	Araçatuba	Asp. Baço	NR	NR	Positivo	13,89	*L. infantum*
116	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	NR	NR	Positivo	199,62	*L. infantum*
117	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	NR	NR	Positivo	20,80	*L. infantum*
118	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	NR	NR	Positivo	210,36	*L. infantum*
121	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	NR	NR	Positivo	0,02	*L. infantum*
122	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	NR	Onicogrifose alopecia dermatite	Positivo	0,04	*L. infantum*
123	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	NR	Assintomático	Positivo	0,08	*L. infantum*

124	cão	Fêmea	Araçatuba	Asp. Baço	NR	Onicogrifose caquexia	Positivo	0,16	*L. infantum*
125	cão	Macho	Araçatuba	Asp. Baço	NR	Onicogrifose	Positivo	11,61	*L. infantum*
134	cão	NR	Araçatuba	Asp. FB	NR	NR	Positivo	35,79	*L. infantum*
135	cão	NR	Araçatuba	Asp. FB	NR	NR	Positivo	6,70	*L. infantum*
136	cão	NR	Araçatuba	Asp. FB	NR	NR	Positivo	7,00	*L. infantum*
138	cão	NR	Araçatuba	Asp. FB	NR	NR	Positivo	23,10	*L. infantum*

NR: Não relatado Asp: Aspirado FB: Fígado e baço

Discussão

5. Discussão

Quando se produz evidências científicas relevantes a saúde pública, o termo epidemiologia é definido como epidemiologia translacional (EpiTrans), onde ocorre a transferência de conhecimentos dos estudos epidemiológicos em planejamento de programas e políticas de controle de doenças (Szklo, 2015). Além dessas, incluem-se: vigilância epidemiológica de doenças, agravos e ocorrências fora do comum; investigação sobre as condições das comunidades; identificação e monitoramento de doenças públicas (Oliveira, 2009; Morais, 2011). O acompanhamento contínuo, manutenção e introdução de medidas de controle ou modificações ao longo de um determinado período, são extremamente importantes (Stellman, 2010).

As leishmanioses têm ampla distribuição por todo o mundo. Nas Américas a forma cutânea é a mais comum da doença enquanto a leishmaniose visceral apresenta-se na forma mais severa e fatal quando não tratada (WHO, 2019). No Brasil, vem apresentando importante expansão e urbanização (Gontijo, 2004). No estado de São Paulo, a introdução da LV, começa por volta de 1999, percorrendo da região oeste para as demais regiões, processo ainda em curso (Cardim *et al*., 2013). Nesse sentido, foi importante analisar amostras de diferentes municípios do estado de São Paulo, já que temos reservatórios silvestres e urbanos, além de vetores, no caso o mosquito *Lutzomyia longipalpis* e diversas espécies que foram identificadas como vetores secundários. E principalmente, analisar diferentes tipos de material biológico, para avaliar a diversidade da carga parasitaria em cães domésticos infectados.

Pouco se conhece sobre a diversidade genotípica das Leishmanioses circulantes no estado de São Paulo. Considerando-se o arsenal de técnicas e metodologias hoje disponíveis para a identificação específica e mesmo de subpopulações dos protozoários, seja para o esclarecimento de pontos obscuros na epidemiologia; rotas de disseminação; na patogenia; na melhoria do

diagnóstico laboratorial; na prospecção de novas drogas ou alvos terapêuticos e, mesmo no prognóstico de evolução clínica, entre outros, torna-se imprescindíveis a detecção e identificação dos agentes etiológicos. A partir disso, a estratégia deste estudo foi realizar as técnicas parasitológicas, sorológicas e moleculares, no intuito de colaborar para uma melhor compreensão desses processos e ajudar na adoção de ações e controle de vigilância diminuindo a expansão da leishmaniose visceral em todo território paulista.

Deste modo, os ensaios moleculares se apresentam como uma ótima alternativa para amplificar DNA de parasito *Leishmania* em animais infectados.

O isolamento é uma técnica que agrega melhoria nos métodos parasitológicos indiretos. Para ser eficiente, alguns cuidados devem ser tomados, tais como: Equipe treinada e equipamentos adequados (Gontijo; Carvalho, 2003), cultivo da amostra em curto espaço de tempo, manipular o mínimo possível as amostras a serem cultivadas (Luz., *et al* 1999) e cuidados assépticos para evitar contaminação, caso contrário os dados podem variar (Junqueira *et al*., 1996; Chiari, 1999; De Carli, 2001). Nesta pesquisa, todos os cuidados foram adotados ao cultivar 32 amostras caninas do município de Bauru. Contudo, 1/32 (3,1%) amostra de aspirado de linfonodo apresentou formas sugestivas de promastigotas de *Leishmania* spp., que ao ser analisada pela técnica de PCR também foi observada amplificação. Essa baixa positividade pode estar relacionada a sensibilidade do teste, já que a da distribuição tecidual não é homogênea ou contaminações durante a colta.

Alguns estudos demonstram diferenças de positividade na cultura. No município de Botucatu/SP, Braga e colaboradores (2014) observaram positividade de 6% em amostras de sangue canina cultivadas em meio LIT+NNN. Porém em outro estudo do mesmo grupo de pesquisa, foi observado formas flagelares em 24,3% das amostras analisadas (Langoni *et al*., 2015). Nos resultados de Thomas-Soccol e colaboradores (2009) ao pesquisar a ocorrência de leishmaniose visceral em amostras de aspirado gânglio poplíteo de 24 cães com sinais clínicos

compatíveis, foi possível isolar formas promastigotas em 19 (79%) cães no meio de cultivo NNN. Ao analisarem amostras de biópsia em oito cães com lesões sugestivas de LTA, em seis (75%) cães foi possível o isolamento de *Leishmania* no meio cultivo NNN/Schneider's Insect Medium (SIGMA) contendo 10% de soro fetal bovino, após uma ou até no máximo três tentativas de lesões diferentes (Madeira *et al*., 2003).

As 31/32 (96,8%) amostras caninas do município de Bauru que foram negativas na cultura, também apresentaram resultados negativos pelo método de PCR, não sendo observado amplificação de DNA de *Leishmania.* Provavelmente no momento da coleta, os cães apresentavam baixa carga parasitária ou reação cruzada contra anticorpos de outro tripanossomatídeo, como *Trypanosoma cruzi* (Troncarelli *et al*., 2009), pois essas amostras foram sororeagentes no TR e ELISA. Mesmo cultivando materiais biológicos como aspirados de medula óssea e punção de linfonodo que são os mais utilizados (Silva, 2007), a análise pode resultar em falso-negativos devido à baixa quantidade de parasitos *Leishmania* presente na amostra, especialmente em cães assintomáticos (Gomes *et al*., 2008).

O isolamento permite a visualização do parasito à microscopia óptica, quer seja o material cultivado (Sangue, aspirado/punção de linfonodo, aspirado/punção de medula óssea) (Lucheis *et al*., 2005). Há diferentes meios de cultura que podem ser utilizados e que determina em diferentes resultados, com maior ou menor positividade (Bertollo; Montanha,2022). Estudos apontam que a sensibilidade da cultura é maior quando se tem um grande volume e quantidade de amostras, quando o tempo entre processamento e coleta é rápido e por fim quando se utiliza meio de cultivo LIT (Portela-Lindonoso; Shikanay-Yasuda, 2003). Afim de minimizar a contaminação e espaço de tempo entre coleta e cultivo, todas as amostras deste estudo foram cultivadas logo após a coleta realizada nos cães. Essas medidas são importantíssimas para que o isolamento parasitário funcione (Padila *et al*., 1999).

No presente estudo, todas as amostras coletadas para a cultura eram

de cães assintomáticos. Um dado preocupante, visto que esses animais podem transmitir o parasito para os insetos flebotomíneos, participando ativamente na transmissão da doença (Laurenti *et al*., 2013). Lembrando que são cães que residem no município de Bauru, região endêmica, ou seja, podem ter contato com o parasito sem desenvolver sintomas da doença, e ficar inaparente por longos períodos (Alvar *et al*., 1994; Molina *et al*., 1994; Abranches *et al*., 1998).

Atualmente, já é consolidado em inquéritos sorológicos para a detecção da leishmaniose visceral canina, o teste TR DPP® LVC como triagem e o EIE LVC como teste confirmatório. Assim, quando uma amostra canina apresenta positividade nos dois testes, o Ministério da Saúde sugere a remoção do cão e logo em seguida a eutanásia. Estas ações são formas de evitar principalmente o surgimento de casos em humanos, porém, vem sendo cada vez mais questionadas, devido a sensibilidade dos testes diagnósticos que devem passar por um controle minucioso de qualidade, evitando a eliminação de cão com diagnóstico falso positivo (Faria; De Andrade, 2012; Mendonça *et al*., 2017), baixa aceitação popular e baixa eficiência dessa medida em modelos teóricos (Dantas-Torres *et al*., 2019).

Devido as suas variações de sensibilidade, os métodos sorológicos dos inquéritos epidemiológicos são assuntos bastante indagados (Grimaldi *et al*., 2012). Neste estudo, foram obtidos 100% (24/24) de positividade para o teste ELISA realizado nas amostras caninas de soro e plasma. Na análise de cPCR 12/15 (80%) amostras de plasma e 3/9 (33,3%) amostras de soro, apresentaram amplificações do DNA de *Leishmania*. Estes resultados dos testes sorológicos e moleculares, pode ter ocorrido devido a alguns fatores: à presença de anticorpos nos cães sem a presença do parasito (Curi *et al*., 2014), pouca quantidade de *Leishmania* spp. circulante durante a coleta, reações cruzadas da sorologia comuns a parasitos da família Trypanosomatidae e uso de sangue periférico, pois apesar de ser uma coleta simples, os animais infectados podem apresentar baixa parasitemia, tornando o teste menos sensível (Fisa *et al*., 2001).

No estudo de Santos e colaboradores (2010), 18 amostras caninas de

sangue total foram positivas sorologicamente (RIFI), enquanto na análise de PCR utilizando *primers* para a região conservada do DNA do cinetoplasto (kDNA), nenhuma delas amplificaram. Uma hipótese já relada por outros autores seria o baixo número de parasitos circulantes na corrente sanguínea (Fisa *et al*., 2001; Monna *et al*., 2004).

Uma alternativa para um diagnóstico preciso, seria a associação de técnicas sorológicas e moleculares, que detecta uma grande quantidade de animais infectados, e consequentemente melhoraria o diagnóstico da doença e contribuiria na identificação de cães falso-negativos (Da Silva *et al*., 2005; Andrade *et al*., 2006).

As análises de biologia molecular utilizadas para detecção e identificação de espécies de *Leishmania* como a cPCR, vem sendo bastante empregadas. É um método sensível e altamente especifico, possibilitando a detecção do DNA do parasito envolvido na transmissão da doença em diversos tecidos e fluídos corporais oriundos de humanos e cães infectados (Moreira *et al*., 2002; Ikonomopoulos *et al*., 2003).

Vários estudos utilizam a técnica cPCR para detectar DNA do parasito *Leishmania*. Almeida (2020), identificou 72 amostras humanas positivas para *Leishmania* a partir da técnica PCR, utilizando iniciadores para os alvos kDNA e ITS-1. Paiz e colaboradores (2019), detectaram DNA de *Leishmania* em amostras de pele de Sagui, em uma área de proteção ambiental. Em Portugal, um grupo de pesquisadores apresentaram resultados significativos, utilizando diferentes protocolos de PCR em amostras de aspirado de medula óssea canina (Albergue *et al*., 2017).

A família Trypanosomatidae é caracterizada por apresentarem um DNA mitocondrial diferenciado, o cinetoplasto (kDNA) que fica na região basal do flagelo, com uma rede com milhares de círculos entrelaçados de DNA: os minicírculos e os maxicírculos.

Nos minicírculos, existem milhares (10.000) de cópias de células e nos

maxícirculos, apenas 30 a 50 cópias. Ao analisar as sequências dos minicírculos de várias espécies de *Leishmania*, foi descoberto uma região de 100-200 pb que é conservada e uma região variável de 550-650 pb (Ray, 1987; Fernandes *et al*., 1999). Essas características demostra o quão excelente o alvo kDNA apresenta para diagnóstico de subgêneros e espécies de *Leishmania* (Rodrigues *et al*., 2002, 2013). Em vista disso, análise de PCR utilizando kDNA como região alvo detecta com alta sensibilidade e especificidade *Leishmania* spp.. (Rodrigues *et al*., 2002, 2013; Moutakki *et al*., 2014).

No presente estudo foi utilizado a técnica de cPCR, com *primers* LINR4/LIN19 que detectam *Leishmania* spp.. Eles foram projetados dentro da área conservada do minicírculo kDNA e contém os blocos de sequência conservada. O minicírculo de kDNA é um alvo ideal, pois sua sequência é conhecida na maioria das espécies de *Leishmania* (Aransay *et al*., 2000), além disso, diversos estudos (57%) tem predileção por essa região alvo em suas pesquisas (Ibarra *et al*., 2022). Diversos estudos utilizam o kDNA como alvo para diagnóstico de LV (Aransay *et al*., 2000; Salotra *et al*., 2001a; Cortes *et al*., 2004; Maurya *et al*., 2005; Langoni *et al*., 2015; Silva *et al*., 2017; Guiraldi, 2020), apresentando excelentes resultados quando testados em diferentes tipos de material biológico (urina, sangue periférico, aspirados de linfonodos, baço e medula óssea (Dourado *et al*., 2007; Moaddeb; Behzadbehbahani, 2008).

Todas as amostras com DNA extraído neste estudo foram analisadas na técnica de cPCR. Das 191 amostras, 151 (79,1%) foram positivas e 40 (20,9%) não apresentaram amplificação. Dentre as 40 (20,9%) amostras negativas, 31/40 (77,5%) são materiais biológicos (Aspirado de linfonodo; Plasma; Aspirado de medula óssea; Fragmento de fígado; Fragmento de baço) provenientes de cultura negativa. No estudo de Quinnell e colaboradores (2001), ao analisarem 126 cães infectados naturalmente, a PCR apresentou um resultado elevado (78-88%) entre 0-135 dias pós infecção e diminuindo cerca 50% após 300 dias. Esses dados sugerem que a técnica de PCR é mais sensível para detectar parasito de *Leishmania*

quando a infecção está ativa ou sintomática. Ou como já relatado anteriormente, este fato pode estar relacionado a baixa carga parasitária no momento da coleta e/ou pela permanência de anticorpos circulantes no sangue mesmo depois da eliminação do parasito. E também devido ao tropismo da cepa, pois sua distribuição não ocorre de forma homogênea nos tecidos, explicando tais variações (Maia; Campino, 2008).

Um ponto importante sobre a parasitemia, é a correlação com os sinais clínicos do cão. Alguns estudos apontaram que animais assintomáticos, apresentam baixa carga parasitária na pele, fígado, baço, medula óssea e linfonodo, em contrapartida, animais com sinais clínicos, apresentaram alta carga parasitária em diversos tecidos (Reis *et al*., 2006; Giunchetti *et al*., 2006, 2008). Em nossa pesquisa, 37/191 (19,4%) amostras são de cães assintomáticos, cujo órgãos analisados foram aspirados de linfonodo (32) e aspirados de baço (5), apresentaram uma média de carga parasitária 63 parasito/mL e 0 parasito/mL respectivamente.

No presente estudo, era esperado que as amostras biológicas de aspirado medulares apresentassem amplificações. Este tecido em análise de PCR, pode ser considerado eficiente na busca do parasito, pois apresenta acúmulo de formas amastigotas de *Leishmania* e parasitismo constante devido ao seu tropismo para órgãos linfóides, além de ser um local que apresenta menor risco de hemorragias (Cotterell *et al*., 2000**;** Brasil, 2014**;** Georgiadou *et al*., 2015). Por conta disso, análises parasitológicas e moleculares utilizando aspirado de medula óssea a qual é uma importante fonte de parasitos, são reportadas com altas sensibilidades (Maia *et al*., 2009; Quaresma *et al*., 2009).

Certamente, o resultado negativo obtido nas amostras de medula óssea em cães neste estudo, possivelmente esteja relacionado ao grau de parasitismo do hospedeiro. Uma vez que, o estado imunológico do animal e a fase da doença afetam diretamente a sensibilidade do método, pois interferem na carga parasitária, dificultando a localização de formas amastigotas (Furtado et al.,

2011).

De acordo com Reis et al., (2006) há uma ligação entre sinais clínicos da LVC e parasitismo nos tecidos. Onde cãess assintomáticos apresentam baixo parasitismo em relação aos cães sintomáticos. Deste modo, observa-se que durante avanço da infecção por Leishmania até a manifestação de sinais clínicos, ocorre um intenso parasitismo na medula óssea, e diferentes graus de parasitismo nos tecidos do organismo.

Vale ressaltar que para o procedimento de aspirados medulares, os cães precisam estar anestesiados, pois além de ser invasiva pode ser traumática (De almeida, 2012).

Uma outra amostra bastante utilizada é o sangue periférico, sua obtenção é mais fácil do que a medula óssea, e também é considerado uma ótima alternativa não invasiva por alguns autores (Strauss-Ayali *et al*., 2004), além de ser altamente eficiente para a detecção da infecção, possuindo sensibilidades de 82% a 100% e especificidade de 100% (Singh *et al*., 1999; Lachaud *et al*., 2000; Xiao-Su *et al*., 2000; Fisa *et al*., 2001).

Neste estudo, 12/15 (80%) das amostras de sangue/plasma analisada na cPCR apresentaram resultados positivos, corroborando com o que é observado em alguns estudos. Porém, existe um certo desencontro de resultados na literatura acerca do seu desempenho na cPCR, pois alguns autores apresentaram alta sensibilidade em suas análises. (Fisa *et al*., 2001; Lachaud *et al*., 2002; Manna *et al*. 2004), enquanto outros demonstraram o contrário (Silva *et al*.; 2001; Borja *et al*., 2016).

A carga parasitária no sangue pode variar no decorrer do tempo, podendo apresentar resultados falsos negativos caso a coleta seja feita no momento em que estiver baixa. (Strauss-Ayali *et al*., 2004). Além disso, o sangue é um tecido de passagem, pois o parasito tem predileção por órgãos como linfonodo, fígado, baço, medula e pele (Oliveira *et al*., 2015). Desta forma, a detecção de DNA pode ser menor em relação aos demais tecidos, devido à baixa

parasitemia (Lopes *et al*., 2017; Riboldi *et al*., 2018).

O baço é o principal órgão acometido na infecção por *Leishmania*, é um dos locais para onde as células infectadas com o parasito migram (Keenan *et al*., 1984). Alguns autores concordam que a disseminação do parasito por meio dos vasos sanguíneos ou linfáticos até fígado, baço, medula óssea, nódulos linfáticos e rins, ocorram a partir de infecções cutânea (Tryphomas *et al*., 1977; Keenan *et al*., 1984). A maior parte de material biológico deste estudo, são de aspirado de baço (97/191= 50,8%), aspirado de fígado e baço (26/191= 13,6 %) e fragmento de baço (2/191= 1,0%), onde na análise de cPCR na busca de DNA de *Leishmania*, estes materiais representam cerca de 80,8% entre as amostras que apresentaram positividade. Alterações no baço de cães com leishmaniose como a esplenomegalia, são as mais comuns, pois é um dos principais locais de predileção do parasito *Leishmania infantum* (Reis *et al*., 2009).

Dentre as amostras que amplificaram, 11/151 (7,3%) são amostras de biópsia de lesão e aspirado de fígado e baço de animais silvestres *Didelphis albiventris, Philander opossum* e *Proechimys iheringi*. No estudo de Brandão-Filho *et al* (2003), também foi encontrado positividade em 18,7% das amostras de animais silvestres na análise de PCR com região alvo kDNA. Donalisio *et al*., (2017), amplificaram DNA de *Leishmania* em duas amostras de *Didelphis albiventris* na cPCR com *primers* que amplificam a região no minicírculo. Já Silva e colaboradores (2016) analisaram 25 amostras de *Didelphis* spp. sendo 23 amostras de *Didelphis albiventris* (gambá-de-orelha-branca) e duas amostras de *Didelphis aurita*, foi detectado por cPCR 4/25 (16%) amostras, DNA de *Leishmnania (V) braziliensis.* Assim como neste estudo, as duas amostras coletadas de *Didelphis albiventris*, amplificaram para *Leishmania*, corroborando com a literatura em relação a positividade no órgão baço.

Apesar dos cães terem apresentado predomínio bem próximo e as vezes até menor que os animais silvestres durantes alguns surtos humanos, esse fato pode estar relacionado as medidas de prevenção aplicadas em relação a

doença (Miró *et al*., 2017; Quaresma *et al*., 2011). Devido a isso, estudos sobre a transmissão, infecção do parasito na fauna silvestre, é importante no que diz respeito a controles de surtos e monitoramento em certas áreas.

Visando a união da saúde humana, animal e ambiental, o conceito de Saúde Única que está consolidado para prevenir e controlar as doenças que acometem os seres vivos de modo geral, tornou-se de grande importância no debate sobre a colaboração de espécies silvestres na transmissão de parasitos (Palatnik-de-Sousa; Dia, 2011; Bidaisee; Macpherson, 2014). Pois devido as ações prejudiciais do homem ao meio ambiente, resultou em uma grande aproximação dos animais silvestres com humanos e animais domésticos (Thompson, 2013).

Assim também, as alterações climáticas e desequilíbrio ecológicos têm contribuído para o crescimento da leishmaniose em animais tanto do ambiente urbano, quanto do silvestre (Ferro et al., 2015). Pois favorece o desenvolvimento de algumas espécies nesse novo ambiente, e podem atuar como hospedeiros e reservatórios no ciclo da LV, como alguns mamíferos roedores e preguiças e também vetores como *L. longipalpis* (Bigeli et al., 2012). Além da subnotificação do meio ruaral, como decorrência a escassez de recursos, infraestrurura, testes diagnósticos, concomitantemente ao processo migratório, condição socioeconômica precária, são fatores que contribuem para o aumento de casos no meio urbano (Rocha et al., 2020).

A técnica de cPCR foi evoluindo com o passar do tempo e foi surgindo diferentes variações, tais como: a seminested PCR e PCR em tempo real (Maia; Campino 2008; Miro *et al*. 2008), tornado os resultados mais robustos com a possibilidade de otimização da técnica.

Para o diagnóstico das leishmanioses, a técnica qPCR pode ser utilizada para monitorar a amplificação do DNA do parasito e quantificar a carga parasitária em diferentes amostras desde 0,03 parasitos por ensaio, correspondendo a 2 fg de DNA. Nesta pesquisa, foi realizada a padronização da técnica para detectar DNA de *Leishmania* em diversas amostras biológicas (Aspirados de baço, fígado e

linfonodo, fragmentos de baço e fígado, soro e plasma). Nas análises executadas foi possível detectar DNA em 72/151 (47,7%) amostras, utilizando *primers* direcionados a região alvo da proteína de choque térmico de 70 kDa da *Leishmania*. Diversos estudos utilizam o ensaio de qPCR para detectar DNA de *Leishmania* (Bretagne *et al*., 2001; Nicolas *et al*., 2002; Jara *et al*., 2013; Ceccarelli *et al*., 2014; Gomes *et al*., 2017).

A qPCR vem sendo utilizada para várias regiões alvo e amostras, desde sangue, medula óssea e pele (De Paiva-Cavalcanti *et al*., 2009; Lombardo *et al*., 2012). De modo geral, a sensibilidade da análise depende muito da região alvo utilizada, os corantes intercalados ou sondas fluorescentes, método de extração de DNA e natureza da amostra.

Nos estudos de Quaresma e colaboradores (2009), foi demonstrado que a carga parasitária de cães sorologicamente positivos em amostras de medula óssea e sangue periférico não apresentaram diferenças em cães assintomáticos e sintomáticos. No presente estudo, não foi possível verificar essa diferença, já que as amostras de medula óssea e sangue não foram analisadas na qPCR. (Gomes *et al*., (2017) analisaram biópsia humanas de pacientes com LT utilizando duas sondas. A sonda SYBR Green, a mesma utilizada neste estudo e a sondaTaqMan. Os autores observaram que o ensaio utilizando SYBR apresentou um nível mais alto de sensibilidade, porém ao analisarem a sensibilidade por tipo de amostra, não tiveram resultado significativo.

Os genes que codificam proteínas também vêm sendo muito utilizados, assim como no presente estudo, a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) foi utilizada como região alvo por apresentar um bom desempenho em várias pesquisas. Na detecção, discriminação e quantificação de *Leishmania* em amostras humanas (Weirather *et al*., 2011), na genotipagem de diferentes espécies de *Leishmania*, onde qPCR foi aclopada à análise de HRM (Hernandéz *et al*., 2014) e na detecção DNA de espécies de *Leishmania* na Colombia (León *et al*., 2017).

No presente estudo, na qPCR utilizamos os *primers* HSP70 devido ao tamanho do *amplicon* e por já serem consolidados tanto para esta técnica, quanto para o HRM. A literatura relata que os *primers* direcionados a região do kDNA são mais sensíveis na detecção do DNA do parasito em relação aos *primers* direcionados para a região proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) (Weirather *et al*., 2011; Ceccarelli *et al*., 2017; Akhoundi *et al*., 2017). Ocorre, que *primers* utilizados neste estudo para a região do kDNA para esta análise, apresentam *amplicons* muito grande.

Uma das análises obtidas com a qPCR é a quantificação. Ao analisarmos nossas amostras, as maiores cargas parasitárias foram identificadas nas amostras de biópsia de lesão e aspirado de fígado e baço. Já as menores também foram em amostras de biópsia de lesão e aspirados de fígado e baço, com esses dados observamos que a sensibilidade do teste por diferentes tipos de tecido, não apresentou diferença significativa, o mesmo foi observado nos estudos de Gomes e colaboradores (2017), porém com amostras de biópsia humanas de pacientes com LT. Isso nos mostra o quanto é variável a sensibilidade da análise em relação a natureza da amostra.

Dentre as 79/151 (52,3%) amostras analisadas que não apresentaram nenhuma carga parasitária, foi evidenciado que entre elas 73/79 (92,4%), a extração de DNA apresentou baixos rendimento e pureza de ácido nucléico. Segundo Matlock (2015) quando a análise da espectrofotometria apresenta valor menor 1,8 na relação de absorbância 260/280, podem indicar indícios de resquícios proteicos, reduzido a sensibilidade na PCR.

Comparar sensibilidade e especificidade dos ensaios moleculares é um grande desafio, pois o resultado depende da amostra, dos *primers*, da técnica de extração utilizadas (De Paiva-Cavalcanti *et al*., 2015) e da integridade do DNA extraído.

Em nossa pesquisa, dentre todas as amostras extraídas e posteriormente analisadas, 138/191 (72,3%) amostras apresentaram valores fora

da relação de absorbância 260/280, considera ótima (entre 1,8 a 2,0) para DNA, o que pode ter levado aos resultados negativos nas análises moleculares. Pois quanto mais íntegro estiver essa amostra, melhores serão o anelamento dos *primers* e amplificação (Silva, 2017). O acondicionamento das amostras, pode influenciar na qualidade do DNA purificado posteriormente, pois as DNAses podem degradar o DNA extraído (Tokuda *et al*., 1990).

A técnica de fusão de alta resolução – HRM, utilizada neste estudo, permitiu a partir de suas análises aprimoradas, identificar espécies de *Leishmania.* Apesar de poucas publicações que abordam esta técnica, alguns pesquisadores já o utilizaram para discriminar espécies de *Leishmania* em diferentes tipos de amostras: Sangue, fragmento de baço e biópsia (Bousslimi *et al*., 2012); isolados de humanos, insetos vetores e mamíferos (Hernandez *et al*., 2014); insetos vetores (Aghaei *et al*., 2014); cultura *Leishmania*, insetos vetores, tecido de roedores, biópsia humana (Zampieri *et al*., 2016); animais silvestres (Guiraldi, 2020); fragmentos de fígado, baço, rim e coração (animais silvestres) e sangue canino (Derghal *et al*., 2022). Ensaio de HRM aplicados em diferentes tipos de amostras, são importantes para estudos epidemiológicos e principalmente entendermos a biologia do parasito e sua interação com o hospedeiro (Zampieri, 2019), já que os locais de predileção de *Leishmania* podem diferir de acordo com o hospedeiro reservatório (Svobodová, Volf, Votýpka, 2016).

No presente estudo, foi possível discriminar espécies de *Leishmania* em 55/72 (76,4%) amostras de diferentes tecidos utilizando os *primers* (HSP70) que amplificam o gene codificador de proteínas do choque térmico (heat shock proteins) de *Leishmania* spp., capazes de caracterizar com eficiência os subgêneros de *Leishmania* (Pita-Pereira *et al*., 2012). Hernández e colaboradores (2014) analisaram 35 isolados obtidos de casos humanos, mamíferos, insetos e vetores com a técnica de HRM, utilizando *primers* direcionados para a região HSP70 e ITS-1, onde foi possível identificar seis espécies de *Leishmania* do Novo Mundo (*L. mexicana, L. infantum, L. amazonensis, L. panamensis, L. guyanensis e L.*

braziliensis). Em nossa pesquisa, trabalhamos com amostras diretas de animais silvestres e cães domésticos, afim de se obter um resultado satisfatório. Ao analisarmos as possíveis de contaminações, verificamos que amostras provenientes de baço apresentam menor quantidade de microrganismos (fungos e bactérias) contaminantes externos, quando comparados com amostras de pele lesionada (Martins, 2013). Já análises com isolados de cultura podem apresentar diferentes sensibilidades de acordo com meio utilizado, da quantidade de material biológico cultivado no tubo. Sem contar as frequentes contaminações por bactérias e fungos, que inviabiliza o diagnóstico (Ferreira, Ávila, 2001; BRASIL, 2014).

No estudo de Aghaae *et al.* (2014), no sudeste do Irã, foram identificados DNA de *Leishmania tropica* em três vetores da espécie *Phlebotomus sergenti*, como marcador genético foi utilizado o (ITS1) do DNA ribossomal nuclear. Um outro trabalho que também fez análise de HRM sendo a região alvo ITS-1, foi o grupo de pesquisadores Talmi *et al* (2010). Ao analisarem 300 amostras (humanos, hospedeiros reservatórios e flebotomíneos), identificaram cinco espécies de *Leishmania* (*L. infantum, L. donovani, L. major, L. tropica* e *L. aethiopica*). Na Tunísia, pesquisadores demonstraram por meio da técnica de HRM duas espécies de *Leishmania* ao analisarem 13 amostras sanguínea de roedores, um fragmento de baço e 3 biópsias. A análise discriminou seis amostras de sangue, duas biópsias e o fragmento de baço como *Leishmania tropica* e uma amostra de sangue como *Leishmania major*. Destas, três foram confirmadas a identidade com o sequenciamento (Bousslimi *et al*., 2012).

Na análise do HRM, 55/72 (76,4%) amostras deram curvas semelhantes as cepas controles *Leishmania infantum* após análise dos gráficos "Derivative Melt Curves", onde todas amostras e cepas controles, demostraram apenas um pico na curva. Além de apresentarem Tm com valores próximos ou iguais as cepas controles. Vale ressaltar que o valor máximo considerável de diferença entre Tm de cepas e amostras é 0,2°C, pois dentro deste valor quer dizer

que o equipamento está preciso, dentro do protocolo padronizado por Zampieri (2019).

Na pesquisa de Guiraldi (2020) o *amplicon* 1 apresentou os melhores resutados, assim como no presente estudo. Além disso também discriminaram espécies de *Leishmania* em animais silvestres (primatas não-humanos) utilizando a técnica de HRM, sendo confirmado pelo sequenciamento genético.

As 55/72 (76,4%) amostras apresentaram Tm no *amplicon* 1 compatível com *Leishmania infantum*, porém no *amplicon* 2 a Tm de 6/55 (10,9%) amostras foram compatíveis com *Leishmania braziliensis* e 12/55 (21,8%) foram compatíveis com *Leishmania amazonensis*. Ao analisar o CT das cepas controles e amostras, foi identificado um CT tardio. De acordo com Zampieri (2019), *L. amazonensis* não são detectáveis pelo amplicon 2, por esse motivo 2 foram identificadas como *L. infantum.*

Agora, se ocorrer o contrário Tm no *amplicon* 1 compatível com *Leishmania infantum* e no *amplicon* 2 compatível com *Leishmania braziliensis* e o CT for precoce, a amostra pode ser considerada como *Leishmania braziliensis,* pois o *amplicon* 2 é eficiente para o subgênero *Viannia*. Este fato foi observado na primeira análise com 7/55 (12,7%) amostras deste estudo, porém o CT na análise dos dois *amplicons* ficaram bem próximo, sendo assim foi preciso realizar toda a técnica novamente. Ao repetir o teste do HRM, foi possível distinguir com clareza os CT tardio do *amplicon* 1, sendo assim as amostras foram identificadas como *Leishmania infantum.* A análise de HRM consegue fornecer uma curva de fusão bem característica para cada espécie, mesmo se as cepas forem de localizações geográficas, vetores e hospedeiros diferentes (Talmi *et al*., 2010).

De acordo com a análise de HRM, 17 amostras foram classificadas como “variantes” por não apresentarem Tm compatíveis com as cepas padrão. Em vista disso, estas amostras foram enviadas para o sequenciamento genético. Porém, as reações falharam e todas as amostras apresentaram possível baixa de concentração de DNA. Resultados assim podem ser esperados, uma vez que se

utiliza o método Sanger para sequenciamento, pois além de apresentar baixo rendimento, necessita que o DNA amplificado esteja em altas concentrações (Polz; Cavanaugh, 1998). Os parâmetros de sequenciamento da empresa *Thermo Fischer- Life Technologies*, relatam possíveis problemas no processo do sequenciamento: Excesso ou falta de material genético na amostra, degradação do DNA, perda de DNA na purificação, problemas na extração e problemas nos sequenciadores.

O uso da técnica de HRM é uma ótima alternativa para a detecção e identificação molecular de espécies de *Leishmania* em amostras biológicas e clínicas. É uma ferramenta confiável que poder ser implementada para levantamentos epidemiológicos em regiões endêmicas (Derghal *et al*., 2022). Apesar de eficaz, sensível e específica demonstrou-se complexa na padronização, exigindo conhecimentos avançados de biologia molecular e interpretação precisa de gráficos no software. Porém, após a padronização, com o estabelecimento de protocolos eficientes, torna-se importante a expansão e a implantação da técnica de HRM em laboratórios de saúde pública que já possuem uma estrutura de biologia molecular para o diagnóstico preciso e confiável das leishmanioses.

6. Intercorrências

A tese foi desenvolvida no Instituto Adolfo Lutz de Bauru que é referência no diagnóstico de diversos agravos de interesse em Saúde Pública. Devido a pandemia do COVID-19, todos os esforços foram concentrados para o atendimento da demanda de diagnóstico molecular de SARS-CoV2, e as análises laboratoriais do projeto foram prejudicadas acarretando atrasos e alterações no desenvolvimento da pesquisa.

Foi necessário aguardar um período entre março de 2020 a novembro de 2020, para voltar a realizar as análises de biologia molecular. Após esse período, as análises foram realizadas em dias e períodos agendados. A normalização do uso das salas e equipamentos, ocorreu em fevereiro de 2021.

Durante o período de pandemia COVID-19, as amostras que iriam ser incluídas na pesquisa dos municípios dos Centros de Laboratórios Regionais de Presidente Prudente, Araçatuba, Marília, São José do Rio Preto e Bauru não puderam ser coletadas. Dessa maneira, não foi possível confeccionar mapas de distribuição, a fim de identificar as rotas de dispersão geográfica das *Leishmania* no estado de São Paulo. Sendo assim, foi feito o possível para a realização das técnicas e análises com as amostras disponíveis.

Conclusões

7. Conclusões

✓ A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), com os *primers* LINR4/LIN19 que amplificam a região do minicírculo kDNA, contribuiu na identificação de amostras positivas.

✓ A técnica de PCR em tempo real (qPCR), além de identificar amostras positivas com os *primers* HSP70F/R, quantificou a carga parasitária do DNA de *Leishmania* em cada amostra analisada.

✓ Foi possível identificar a espécie *Leishmania infantum* tanto nas amostras procedentes de cães domésticos, quanto nas amostras de animais silvestres com a análise de HRM.

✓ De modo geral, a investigação molecular com o uso das técnicas de PCR é uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos. A partir desses resultados, recomenda-se o uso associado da técnica de HRM com iniciadores direcionados à região da proteína de choque 70 kDa térmico, a fim de aumentar a sensibilidade do teste, detectar e discriminar espécies de Leishmania.

✓ A técnica de HRM é uma alternativa com menor custo e mais rapidez para identificação de espécies dos agentes etiológicos das leishmanioses em diagnóstico e estudos eco-epidemiológicos.

Referências

Referências

Abranches P, Campino L, Santos-Gomes GM. Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. Acta Med Port. 1998; (10): 871-5.

Aguilar CM, Rangel EF, Garcia L, Fernandez E, Momen H, Grimaldi Filho G, Vargas Z. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1989; 84 (1): 19-28.

Aghaei Afshar A, Rassi Y, Sharifi I, Vatandoost H, Mollaie HR, Oshaghi MA, Rafizadeh S. First report on natural *Leishmania* infection of Phlebotomus sergenti due *Leishmania* tropica by high resolution melting curve method in Southeastern Iran. Asian Pac J Trop Med. 2014; 93-96.

Agne MAV, Guimarães RL, Brandão LAC, Souza PRED, Carvalho ADAT, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A REVIEW. Brazilian Journal of Microbiology. 2009; 40: 1–11.

Albuquerque A, Campino L, Cardoso L, Cortes S. Evaluation of four molecular methods to detect Leishmania infection in dogs. Parasites & Vectors. 2017; 10(1): 1-5.

Alvar J. Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. The journal of Advances in Parasitology. 2004; 57: 1-88.

Alvar J, Molina R, San Andres M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, Escacena C. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. Ann Trop Med Parasitol. 1994; 88(4): 37-8.

Almeida, JV. Diagnóstico e caracterização de Leishmania spp. em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose cutânea no estado de Roraima. [Tese] Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; 2020.

Alves-Martins MF. Detecção de tripanosomatídeos em gatos domésticos de região endêmica para leishmaniose visceral por técnicas parasitológicas, sorológicas e moleculares [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP; 2017

Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. Cadernos de Saúde Pública.

2004;20(1):259-265.

Akhoundi M, Katrin K, Arnaud C, Jan V, Pierre M, Pascal D, Denis S. A historical overview of the classification, evolution and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2016; 10(6): e0004349.

Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls, K, Lukeš J, Cannet A, Sereno D. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. Molecular aspects of medicine. 2017; 57: 1-29.

Andrade HM, Reis AB, Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify Leishmania species in naturally-infected dogs. Veterinary Parasitology. 2006; 140: 231-238.

Aragão HB. Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo Phlebotomus intermedias. Brasil Medico 1922; 36:129–130.

Aransay AM, Scouulica E, Tselentis Y. Detection and identification of Leishmania DNA within Naturally infected Sand Flies by Seminested PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. Applied Environmental Microbiology. 2000; 66: 1933-1938.

Ashtiani ZO, Mehrsai AR, Pourmand MR, Pourmand G. High Resolution Melting Analysis for rapid detection of PIK3CA gene mutations in bladder cancer: A mutated target for cancer therapy. Urol Oncol. 2017;15(01):6000- 5.

Bacha HA, Tuon FF, Zampieri RA, Floeter-Winter LM, Oliveira J, Nicodemo AC, Amato VS. Leishmania (Viannia) brasiliensis identification by PCR in the state of Para, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2011; 105: 173-8

Barata RCB. O desafio das doenças emergentes e a revalorização da epidemiologia descritiva. Revista Saúde Pública 1997; 31(5): 531-7.

Barret M, Burchmore R, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ. The trypanosomiases. Lancet. 2003; 362(9394): 1469-80.

Basano SA, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Revista Brasileira de epidemiologia, Monte Negro. 2004; 7(3): 328-336.

Bertollo DMB, Montanha JOM. Experiência exitosa no isolamento axênico de Leishmania infantum em meio de cultura enriquecido com sangue de equino. PUBVET. 2022; 16: 207.

Bianco B, Mafra FA, Paiva CP. Reação em Cadeia da Polimerase. Biologia Molecular: Métodos Interpretativos – Col. Análises Clínicas e Toxicológicas. 1. ed., Editora Roca, Rio de Janeiro. 2015; 254.

Bidaisee S, Macpherson CNL. Zoonoses and one health: a review of the literature. J Parasitol Res. 2014; 2014: 874345. Pmid :24634782

Bigeli JG, Oliveira Júnior WPD, Teles NMM. Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2012; 45: 18-23.

Borghesan TC. Diversidade e Filogenia de Tripanosomatídeos parasitos de dípteros[tese]. São Paulo: Universidadede São Paulo; 2013.

Borja LS, Sousa OM F, Solcà MDS, Bastos LA, Bordoni M, Magalhães JT, Laranjeira DF, Barrouin-melo SM. A carga parasitária no sangue e na pele de cães naturalmente infectados por Leishmania infantum está correlacionada com sua capacidade de infectar vetores de flebotomíneos. Vet Parasitol. 2016; 229: 110-117.

Bousslimi N, Ben-Ayed S, Ben-Abda I, Aoun K, Bouratbine A. Natural Infection of North African Gundi (Ctenodactylus gundi) by *Leishmania tropica* in the Focus of Cutaneous Leishmaniasis, Southeast Tunisia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2012; 86(6): 962–5. pmid:22665601

Braga ARC, Langoni H, Lucheis SB. Evaluation of canine and feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and polymerase chain reaction. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2014;20:1-7.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral /Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças tropicais negligenciadas. Boletim epidemiológico, Brasília:MS; 2021. Acesso: 6 junho de 2022. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-

conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral /Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral. 2022. Acesso em: 12 junho de 2022. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral.

Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikaw EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of Leishmania (Viannia) braziliensis in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003; 97(3): 291–296.

Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin J-F, Sulahian A, Rivollet D, et al. Real-time PCR as a new tool for quantifying Leishmania infantum in liver in infected mice. Clin Vaccine Immunol. 2001; 8: 828–31.

Brodskyn CI, Kamhawi S. Biomarkers for Zoonotic Visceral Leishmaniasis in Latin America. Front Cell Infect Microbiol. 2018; 8:245. doi: 10.3389/fcimb.2018.00245

Burza s, Croft SL, Boelaert M. “Leishmaniasis-authors’ reply”. The Lancet. 2018; 393 (10174): 872-873.

Caldart ET, Freire RL, Ferreira FP, Ruffolo BB, Sbeghen MR, Mareze M, G JL, Regina Mitsuka-BreganóItalmar R, Navarro T. Leishmania in synanthropic rodents (Rattus rattus): new evidence for the urbanization of Leishmania (Leishmania) amazonenses. Rev Bras Parasitol Vet. 2017;26(1): 17-27.

Campos R, Tunon G, Cunha L, Moraes J, Ramalho D, Lima S, Almeida LP. Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in na endemic área in northeastern Brazil. Geospatial Health. 2017; 12(1): 67-73.

Cardim MFM, Rodas LAC, Dibo MR, Guirado MM, Oliveira AM, Chiaravalloti Neto F. Introdução e expansão da leishmaniose visceral americana em humanos no Estado de São Paulo, 1999-2011. Rev Saude Publica. 2013; 47(4): 691-700. DOI:10.1590/S0034-8910.2013047004454

Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M. Detection and characterization of Leishmania (Leishmania) and Leishmania (Viannia) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. PLoS One. 2014; 9: e88845
.
Chiari E. Chagas Disease diagnosis using Polymerase Chain Reaction, hemoculture and serologic methods. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94: 299-300.

Chulay JD, Bryceson AD. Quantitation of amastigotes of Leishmania donovani in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1983; 32: 475-9.

CORBETT LIFE SCIENCE. High resolution melt assay design and analysis: rotor gene 6000. CorProtocol. 2006:1-21.

Conceição-Silva F, Alves CR. Leishmanioses do continente americano. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. Leishmaniose: uma apresentação, 2014.

Cortes S, Rolão N, RamadAJ, Campino, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using Leishmania donovani s.l.-specific kinetoplastid primers. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2004; 98(1): 12–7.

Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. Leishmania donovani infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. Blood. 2000; 95(5): 1642-51.

Coura FM, Passos SKP, Pelegrino MOF, Leme FOP, Paz GF, Gontijo CMF, CostaVal APC. Serological, molecular, and microscopic detection of Leishmania in cats (Felis catus) in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2018; 27(4).

Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of the New Word Leishmania using numerical zymotaxonomy. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1994; 50:296-311.

Curi, NHA, Paschoal AMDO, Massara RL, Marcelino AP, Ribeiro AA, Passamani M, Chiarello AG. Factors associated with the seroprevalence of leishmaniasis in dogs living around atlantic forest fragments. Plos One. 2014; 9: 1.

Centro de Vigilância Epidêmiológica (CVE). Casos confirmados de leishmaniose visceral. 2022a. Acesso: 14 de fevereiro 2022. Disponível:

https://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/leish/lv1722_lpi.pdf

Centro de Vigilância Epidêmiológica (CVE). Casos e óbitos confirmados de leishmaniose visceral. 2022b. Acesso: 14 de fevereiro de 2022. Disponível: https://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/leish/lv9916_sh_gve.htm

Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodriguez A, Alvar J. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. Lancet 2002; 359: 1124– 1125.

Dantas-Torres F, Miró G, Baneth G, Bourdeau P, Breitschwerdt E, Capelli G, Otranto D. Canine leishmaniasis control in the context of one health. Emerging infectious diseases. 2019; 25(12): 1.

Da Silva AVM, De Paula AA, CAbrera MAA, Carreira JCA. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. Caderno de Saúde Pública. 2005; 21(1): 324-328.

De Almeida FS. Avaliação do potencial de amostras clínicas de coleta não invasiva para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral canina por PCR [Dissertação]. 2012

De Assis WA, Malta J, Pimenta PFP, Ramalho-Ortigão JM, Martins GF. The characterization of the fat bodies and oenocytes in the adult females of the sand fly vectors Lutzomyia longipalpis and Phlebotomus papatasi. Arthropod Struct Dev. 2014; 43(5): 501-9.

Dedet JP, Gay F, Chatenay G. Isolation of Leishmania species from wild mammals in French Guiana. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989; 83:202–207.

De Carli GA. Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico de Parasitoses Humanas. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, RJ. 2001: 810.

Del Río L, Chitimia L, Cubas A, Victoriano I, De la Rúa P, Gerrikagoitia X, Barral M, Munoz-García CI, Goyena E, García-Martínez D, Fisa R, Riera C, Murcia L, Segovia M, Berriatua E. Evidence for widespread Leishmania infantum infection among wild carnivores in L. infantum periendemic northern Spain. Prev. Vet. Med. 2014; 113: 430- 435.

Derghal M, Tebai A, Balti G, Souguir-Omrani H, Chemkhi J, Rhim A, Bouattour A, Guizani I, M'Ghirbi Y, Guerbouj S. High-resolution melting analysis identifies reservoir hosts of zoonotic Leishmania parasites in Tunisia. Parasit Vectors. 2022;15(1): 12. doi: 10.1186/s13071-021-05138-x. PMID: 34996507; PMCID: PMC8742351.

De Paiva -Cavalcanti M. Leishmaniases diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. Cell Biosci. 2015; (17)5: 2015.

Dietze R. Diagnóstico sorológico e parasitológico da Leishmaniose Visceral. In: Organización Panamericana de la Salud. Consulta de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. Rio de Janeiro: PANAFTOSA. 2006:63-5.

Diotallevi A, Buffi G, Ceccarelli M, Neitzke-Abreu HC, Gnutzmann LV, da Costa Lima JMS, Galluzzi L. Real-time PCR to differentiate among Leishmania (Viannia) subgenus, Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Leishmania) amazonensis: Application on Brazilian clinical samples. Acta tropica. 2020:201.

Diretoria De Vigilância Epidemiológica (DIVE). GERÊNCIA DE VIGILÂNCIA DE ZOONOSES. Doença de Chagas. 2017.

Donalisio MR, Paiz LM, da Silva VG, Richini-Pereira VB, von Zuben APB, Castagna CL, Motoie G, Hiramoto RM, Tolezano, JE. Visceral leishmaniasis in an environmentally protected area in southeastern Brazil: Epidemiological and laboratory cross-sectional investigation of phlebotomine fauna, wild hosts and canine cases. PLoS Negl. Trop. Dis. 2017; 11: e0005666.

Dourado ZF, Silva HD, Silveira-Lacerda EP, Garcia-Zapata MTA. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). Rev Patol Trop. 2007; 36(3): 2015-14.

Edvinsson B. Molecular diagnosis of infection with Toxoplasma gondii immunocompromised patients [Tese]. Estocolmo: Karolinska Institutet; 2006.

Edwards T, Sasaki S, Williams C, Hobbs G, Feasey NA, Evans K et al. Speciation of common Gram-negative pathogens using a highly multiplexed high resolution melt curve assay. Scientific Reports. 2018; 8: 1114.

Espinosa AO, Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MMG, Shaw JJ. Na appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as Leishmania and Endotrypanum. Parasitology. 2016; 145: 430-42.

Faria AR, Andrade HM. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes

avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. Rev Pan-Amaz Saúde. 2012; 3(2): 47-57.

Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. In DIAGNOSTICO LABORATORIAL DAS PRINCIPAIS DOENCAS INFECCIOSAS E AUTO-IMUNES. 2001; 443.

Ferro C, López M, Fuya P, Lugo L, Cordovez JM, González C. Spatial distribution of sand fly vectors and eco-epidemiology of cutaneous leishmaniasis transmission in Colombia. PloS one. 2015; 10(10): e0139391.

Fernandes O, Catanho MP, Segura I, Labrada LA, Derre R, Saravia N, Degrave W. Minicircle variable region probes for characterization of Leishmania (Viannia) species. Journal of Parasitology, Lawrence. 1999; 85(1): 563-8.

Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, Portus M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. Vet Parasitol. 2001; 99: 105-111.

Foganholi JN, Zappa V. Importância da leishmaniose na saúde pública. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. Ano IX, n. 17, 2011.

Forattini OP. Nota sobre o encontro de leishmanias em roedores silvestres de zona endêmica de leishmaniose no Estado de São Paulo, Brasil. Rev.Paul. Méd., São Paulo. 1958; 53(2): 155.

Furtado MVL, Viol MA, Babo-Terra VJ. Pesquisa de amastigotas de *Leishmania* spp. em linfonodos, medula óssea, baço, pele e sangue de cães naturalmente infectados. PUBVET, Londrina. 2011; 5(30): 177.

Galimberti MZ, Katz G, Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Casanova C, et al. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 1999; 32(Supl I): 217–8.

Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotallevi A, Menotta M, Magnani M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. Parasites & vectors. 2018;11(1):1-13.
Garcia AL, Kindt A, Quispe-Tintaya KW, Bermudez H, Llanos A, Arevalo A, et al. American tegumentary leishmaniasis: antigen gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. Infect Genet Evol 2005; 5: 109–116.

Graça GC, Volpini AC, Romero GAS, Oliveira Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, Boité MC, Cupolillo E. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species.

Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012; 107(5): 664-674.

Gebreyes WA, Jackwood D, Oliveira CJB, Lee CW, Hoet AE, Thakur S. Molecular Epidemiology of Infectious Zoonotic and Livestock Diseases. Microbiology Spectrum. 2020; 8(2).

Giudice E, Passantino A. Detection of Leishmania amastigotes in peripheral blood from four dogs--Short communication. Acta Vet Hung. 2011; 59(2):205-13.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Reis AB. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the Leishmania (Leishmania) chagasi burden in dermal inflammatory foci. Journal of comparative pathology. 2006; 135(2-3): 100–7.

Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Roatt BM, de Oliveira Aguiar-Soares, RD, Reis AB. A killed Leishmania vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. Vaccine. 2008; 26(5): 623–38.

Gomes CM, Cesetti MV, de Paula NA, Vernal S, Gupta G, Sampaio RNR, et al. Field validation of SYBR Green- and TaqMan-based real-time PCR using biopsy and swab samples to diagnose American tegumentary leishmaniasis in an area where Leishmania (Viannia) braziliensis is endemic. J Clin Microbiol. 2017; 55: 526–34.

Gomes YM, Cavalcanti MP, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. Vet J. 2008 ;175(1): 45-52.

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36(1): 71-80

Gontijo CM, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol. 2004; 7(3): 338-49

Gradoni L, Gramiccia M, Leishmaniosis. In: OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). Paris: Office International des Epizooties, 2008;(1): 240-250.

Graham R, Liew M, Meadows C, Lyon E, Wittwer CT. Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting. Clin Chem 2005; 51: 1295-1298.

Gramiccia M, Maazoun R, Lanotte G, Rioux JA, Le Blancq S, Evans DA, et al. Enzymatic typing of 11 strains of Leishmania isolated, in mainland Italy from the

visceral murine, canine and vulpine forms: demonstration of an enzymatic variant in the fox (Vulpes vulpes) and the dog. Ann Parasitol Hum Comp. 1982; 57: 527-31.

Grimaldi G, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Souza Pinto I, Azevedo CT, Falqueto A. Evaluation of a novel chromato graphic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPPCVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2012; 106: 54–59.

Guerra JAO, Jéfferson Augusto Santana Ribeiro JASR, Coelho LIARCC, Barbosa MGV, MG. Epidemiology of tegumentary leishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil. Cad. Saúde Pública. 2006; 22 (11): 2319-2327.

Guiraldi LM. Pesquisa de Leishmania spp. em primatas de cativeiro de cinco regiões brasileiras por diferentes técnicas de diagnóstico. [Tese] – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu; 2020.

Gushi LT. Estrutura populacional de Lutzomya longipalpis através da amplificação e sequenciamento do segmento ribossomal 12s de DNA mitocondrial [Dissertação] Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2008.

Hart DT. "The Scientific Proceedings of “Leishmaniasis: The First Centenary 1885–1985”: Held at The Royal Army Medical College, 9th November, 1985." BMJ Military Health. 1986; 132(3): 127-152.

Hepp D, de Nonohay JS. A importância das técnicas e análises de DNA. ScientiaTec. 2016; 3(2): 114-124.

Hernández C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez JD. Identification of Six New World Leishmania species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. Parasit Vectors 2014; 7: 501.

Hiramoto RM, Oliveira SS, Rangel O, Henriques LF, Taniguchi HH, Barbosa JER, Casanova C, Viviani Jr A, Sampaio SM, Spinola R, Rehder S, Lindoso JAL, Tolezano JE. Classificação epidemiológica dos municípios do Estado de São Paulo segundo o Programa de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral. 2019. BEPA; 26 (192): 29-46.

Hossain F, Ghosh P, Khan MAA, Duthie MS, Vallur AC, Picone A, et al. Real-time PCR in detection and quantitation of Leishmania donovani for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis patients and the monitoring of their response to

treatment. PLoS One. 2017; 12(9): e0185606.

Ibarra-Meneses AV, Corbeil A, Wagner V, Onwuchekwa C, Fernandez-Prada C. Identificação de infecções assintomáticas por Leishmania: uma revisão de escopo. Vetores parasitas. 2022; 15(1): 5. doi:10.1186/s13071-021-05129-y

Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. Veterinary Parasitology. 2003; 113(2): 99-113.

Jara M, Adaui V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of Leishmania (Viannia) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. J Clin Microbiol. 2013; 51: 1826–33.

Junqueira ACV, Chiari E, Wincker P. Comparison of the Polymerase Chain Reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in a endemic region of North-Eastern Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996; 90: 129-32.

Jusi MM, Starke-Buzetti WA, Oliveira TM, Tenório MS, Sousa LO, Machado RZ, Molecular and serological detection of Leishmania spp. In captive wild animals from Ilha Solteira, Sp, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2011; 20(3): 219-222.

Kafetzis DA. An overview of paediatric leishmaniasis. J Postgrad Med. 2003; 49:31-8.

Kaltenboeck B, Wang C. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. Advances in Clinical Chemistry, New York. 2005;40(4):219-259.

Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Webster HK, Johnson AJ. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. Infection, clinical disease, and clinical pathology. Vet. Pathol. 1984; 21: 74-79.

Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GE, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA, Schönian G. Comparative microsatellite typing of new world Leishmania infantum reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. PLoS Negl. Trop. Dis. 2011; 5: p. e 1155.

Kumar S, Steicher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular biology and Evolution. 2016; 33(7):

1870-4.

Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP, Bastien P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. Parasitology. 2002; 125: 197-207.

Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E, Bastien P. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. Journal of clinical microbiology. 2000; 38(1): 236-240.

Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis - The Neotropical Leishmania Species. In: Topley & Wilson Microbiology and Microbial Infections, ed. FEG Cox. 1998; 242- 266.

Langoni H, Richini-Pereira VB, Scremin C, Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, et al. Detecção molecular de Leishmania spp. em material de hemocultura, e diagnóstico sorológico para leishmaniose em cães procedentes do bairro da Conquista, São Manuel-São Paulo, Brasil. Vet Zootec. 2015 ;22(4): 580-90.

Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VLR, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC, Marconde M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. Veterinary Parasitology. 2013; 196(3-4): 296-300.

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION. A guide to High Resolution Melting (HRM) analysis. 2010. Acesso 17 de abril 2022. Disponível em: real-time-pcr-handbook.pdf (thermofisher.com)

Lindenberg A. A úlcera de Bauru e seu micróbio. Revista de Medicina de Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo. 1909; 12: 116-120.

León CM, Muñoz M, Hernández C, Ayala MS, Flórez C, Teherán A, et al. Analytical performance of four polymerase chain reaction (PCR) and real time PCR (qPCR) assays for the detection of six Leishmania species DNA in Colombia. Front Microbiol. 2017; 8: 1907.

Lima JR de. Estudo prospectivo de pacientes com leishmaniose tegumentar Americana em Manaus (AM): fatores imunológicos envolvidos no curso terapêutico com antimonial pentavalente. [Dissertação] (Mestrado em Biologia Parasitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de janeiro, RJ; 2017.

Lima VM, Santiago ME, Sanches LC, Lima BD. Molecular diagnosis of Leishmania amazonensis in a captive spider monkey in Bauru, São Paulo, Brazil. J Zoo Wildl Med. 2012; 43(4):943-5.

Lindoso JAL, Cunha MA, Queiroz IT, Moreira CHV. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. HIV AIDS (Auckl). 2016; 8: 147-56.

Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Migliazzo A, Caprì A, Solano-Gallego L. Detection of Leishmania infantum DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. Vet. Parasitol. 2011; 184(1): 10-17.

Lopes EG, Sevá AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB, Hiramoto RM, Ferreira HL. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. Epidemiol Infect. 2017; 145(12): 2436-2444

Lucheis SB, Da silva AV, Araújo JRJP, Langoni H, Meira DA, Marcondes-Machado J. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas'disease living in Botucatu town and surrounding region. São Paulo State, Brazil. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2005; 11(4): 492-509.

Luppi MM, Malta MC, Silva TM, Silva FL, Motta RO, Miranda I, Ecco R, Santos RL. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. Vet. Parasitol. 2008; 155: 146- 151.

Luz ZMF. Changes in the Hemoculture Methodology Improve the Test Positivity. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1999; 94: 295-298.

Madeira MDF, Uchôa CMA, Leal CA, Silva RMM, Duarte R, Magalhães CM, Serra CMB. Leishmania (Viannia) braziliensis em cães naturalmente infectados. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2003; 36: 555.

Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Vet Parasitol. 2008; 158(4): 274-87.

Maia C, Ramada J, Cristovão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. The Veterinary Journal. 2009; 179(1): 142-144.

Makowiecky ME, Mattos MS, Tormem SH, Gatti RR, Biz DM, Pereira R, et al. Manual de orientação de LTA. Santa Catarina. Vigilância Epidemiológica; 2016. Acesso: 15 de outubro 2021. Disponível em:http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Manual_de_Ori

entacao_de_LTA_revisado.pdf

Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. Vet Parasitol. 2004; 125: 251-262.

Marcondes M, Rossi CN. Visceral leishmaniasis in Brazil. Braz J Vet Res Anim Sci. 2013;50(5):341-52.

Martins TFC. Análise da eficiência da PCR com identificação específica do agente etiológico para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. [Tese]. Universidade de São Paulo; 2013.

Martínez MF, Kowalewskib MM, Giuliania MG, Acardi AS, Salomón OD. Molecular identification of Leishmania in free-ranging black and gold howler monkeys (Alouatta caraya) in northeastern Argentina. Acta Trop. 2020; doi: https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105534.

Matlock B. Assessment of Nucleic Acid Purity. Wilmington, MA, USA: Thermo Fisher Scientific Inc; 2015. Technical Note 52646.

Maurya R, Singh RK, Kumar B, Salotra P, Rai M, Sundar S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. Journal of clinical microbiology. 2005; 43(7): 3038– 41.

Moadab A, Behbahani A, Behzad. "A simple and rapid DNA purification method for detection of leishmania DNA in peripheral blood of patients with visceral leishmaniasis." 2008: 75-81.

Moretti AIP, Ferreira MC. Dinâmica espacial e regionalização da Leishmaniose Tegumentar Americana no estado de São Paulo. Geografia. 2011; 36(3): 453-468.

Mendonça ILD, Batista JF, Werneck GL, Soares MRA, Costa DL, Costa CHN. Serological tests fail to discriminate dogs with visceral leishmaniasis that transmit Leishmania infantum to the vector Lutzomyia longipalpis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2017; 50: 483-488.

Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JÁ, et al. Infectivity of dogs naturally infected with Leishmania infantum to colonized Phlebotomus perniciosus. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1994; 88(4): 491-3.

Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Garcia M, Fonsenca L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del

ADN. Rev Cuba Med Trop. 2012;64(2):108-31.

Morais MHF. Avaliação das atividades de controle da leishmaniose visceral na Regional Noroeste de Belo Horizonte, 2006 a 2010. [tese]: Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais: Instituto de Ciências Biológicas; 2011.

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Nunes CM, Silva TCCD, Laurenti MD, Corbett CEP. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 2002; 39: 103-106.

Moreira OC, Yadon ZE, Cupolillo E. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: current status and perspectives. Acta Trop. 2017;29(17):30485-0.

Mouttaki T, Mouttaki T, Morales-Yuste M, Merino-Espinosa G, Chiheb S, Fellah H, Martin-Sanchez J, Riyad M. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative Leishmania species in Morocco by using three PCR-based assays. Parasites & Vectors, London. 2014; 7(1): 1 – 9.

Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2016.

Miró G, Troyano A, Montoya A, Fariñas F, Fermín ML, Flores L, Rojo C, Checa R, Gálvez R, Marino V, Fragío C, Martínez-Nevado E. First report of Leishmania infantum infection in the endangered orangutan (Pongo pygmaeus pygmaeus) in Madrid, Spain. Parasit Vectors. 2018; 11: 186.

Narvajas IM, Alba Díaz, Bassegoda O, Carpio A, Fuster C, Valls ME, Alvarez-Martínez MJ, García-Vidal C, Soriano A, Martínez JA, Ambrosioni J. Acute liver failure due to visceral leishmaniasis in Barcelona: a case report. BMC Infect. Diseases. 2019; 19(874).

Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-time PCR for detection and quantitation of Leishmania in mouse tissues. J Clin Microbiol. 2002; 40: 1666–9.

Navea-Pérez HM, Díaz-Sáez V, Corpas-López V, Merino-Espinosa G, Morillas, Márquez F, Martín-Sánchez J. Leishmania infantum in wild rodents: reservoirs or just irrelevant incidental hosts? Parasitol. Res. 2015; 114: 2363–2370.

Novais CM, Pires-Alves M, Silva FF. PCRem tempo real. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento-Edição. 2004; 33: 11.

Nunes CM, Dias AKK, Gottardi FP, De Paula HB, De Azevedo MAA, De Lima VMF, Garcia JF. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2007; 16(1): 5-9.

Oliveira AC, Figueiredo FB, Silva VL, Santos FN, Souza MB, Madeira MF, Abrantes TR, Périssé ARS. Canine visceral leishmaniasis case investigation in the jacare region of niteroi, Rio de Janeiro, Brazil. Rev. Inst. Med. trop. 2015;57(4): 325-332.

Oliveira AM, Vieira CP, Dibo MR, Guiraldo MM, Rodas LAC, Chiaravalloti Neto F. Dispersal of Lutzomya longipalpis and expansion of canine and human visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. Acta Tropica. 2016: 164(2016):233-42.

Oliveira MRF. Áreas de aplicação da epidemiologia nos serviços de saúde. Epidemiol Serv Saúde. 2009; 18(2): 105-6.

Oryan A, Akbari M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. Asian Pac J Trop Med. 2016;9(10):925-32.

Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO). Leishmaniosis. Washington;2017. Acesso 05 setembro 2021. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13648:leishmaniasis-fact-sheet-health-workers&Itemid=40721&lang=en

Padilla AM, Marco DJ, Diosque P, Malchiodi E, Fernández M, Marinconz A, Basombrio MA. Leishmaniasis tegumentaria canina: evolutión de las lesiones y carga parasitaria. Medicina 59 (suppl III):54, 1999.
Paixão-Marques MS, Alves-Martin MF, Guiraldi LM, Santos WJ, Lemos FA, Sánchez GP, Richini-Pereira VB, Lucheis SB. First isolation of Leishmania infantum by blood culture in bovines from endemic area for canine visceral leishmaniasis. Parasitology. 2019; 1: 1-3

Paiz LM, Fornazari F, Menozzi BD, Oliveira GC, Coiro CJ, Teixeira CR, DA Silva VMC, Donalisio MR, Langoni H. Serological evidence of infection by Leishmania (Leishmania) infantum (Synonym: Leishmania (Leishmania) chagasi) in free-ranging wild mammals in a nonendemic region of the state of São Paulo, Brazil. Vector-Borne Zoonot. Dis.2015; 15(11): 667-673.

Paiz LM, Motoie G, Richini-Pereira VB, Langoni H, Menozzi BD, Tolezano JE, Donalisio MR. Antibodies and Molecular Detection of Leishmania (Leishmania) infantum in Samples of Free-Ranging Marmosets (Primates: Callitrichidae: Callithrix spp.) in an Area of Canine Visceral Leishmaniasis in Southeastern Brazil.

Vector-borne And Zoonotic Diseases. New Rochelle: Mary Ann Liebert, Inc. 2019;19(4):249-254, 2019. Available at: <http://hdl.handle.net/11449/184956>.

Palatnik-de-Sousa CB, Day MJ. One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. Parasit Vectors. 2011;4: 197. pmid:21985335

Pan-American Health Organization (PAHO, 2019). Manual de procedimentos para vigilância y control de las Leishmaniasis em las Américas. Acesso em: 06 de setembro de 2020. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631_spa.pdf

Paniz MAE, Colmenares GA, Mendoza PY, Hernández-Pereira CE, Medina C, Vargas F, Sandoval D, Agüero J, Román D, Forlano-Riera M, Salas Y, Peraza M, Romero P, Aldana F, Castillo T, Santeliz S, Perez G, Suarez-Alvarado MJ, Morales-Panza RJ, Kato H. Autochthonous cutaneous leishmaniasis in urban domestic animals (Felis catus / Canis lupus familiaris) from central-western Venezuela. Acta Trop. 2019; 191: 252-260.

Pereira da Fonseca IM, Villa de Brito MT. Capítulo VI: Diagnóstico. Leishmaniose Canina. Lisboa: Chaves Ferreira–Publicações, SA. 2008: 83-91.

Pessoa SB. Ensaios sobre a distribuição geográfica de algumas endemias parasitárias em São Paulo. Arquivos de Higiene e Saúde Pública. 1941; 11: 7-25.

Pinto, PLS. Circulação e caracterização do *Trypanossoma cruzi* isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo, Brasil [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2000.

Pita-Pereira D, Souza GD, Pereira TA, Zwetsch A, Britto C, Rangel EF. Lutzomyia (Pintomyia) fischeri (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American cutaneous leishmaniasis: detection of natural infection by Leishmania (Viannia) DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. Acta Trop. 2011; 120: 273- 5.

Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BA, Moreira OC, Brazil RP, Britto C. SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to 203 discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniases. Parasit Vectors. 2012; 12: 5:15.

Polz MF, Cavanaugh CM. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. Applied and environmental Microbiology. 1998; 64(10): 3724-3730.

Portela-Lindoso AAB & Shikanay-Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: do

xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. Rev Saúde Pública. 2003; 37(1): 107-115.

Quaresma P, Murta S, Ferreira E, Rocha-Lima A, Xavier A, Gontijo C. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of Leishmania species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by realtime PCR. Acta Tropica. 2009: 111(3): 289-94.

Quaresma PF, Rego FD, Botelho HÁ, da Silva SR, Moura AJ, Teixeira Neto RG, Madeira FM, Carvalho MB, Paglia AP, Melo MN. Hospedeiros silvestres, sinantrópicos e domésticos de Leishmania em área endêmica de leishmaniose tegumentar em Minas Gerais, Brasil. Trans. R. Soc. Tropa Med. Hyg. 2011; 105: 579-585.

Queiroz MJA, Alves JGB, correia JB. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. J. Pediatr. 2004;80(2). DOI: http://dx.doi.org/10.1590/S0021-75572004000200012.

Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, Dye C. Detection of Leishmania infantum by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. Parasitology. 2001; 122(3): 253-261.

Ray DS. Kinetoplast DNA minicircles: high-copy-number mitochondrial plasmids. Plasmid, New York. 1987; 17(3): 177-190.

Reed GH, Kent JO,Witter CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and effiecent molecular diagnostics. Pharmacogenomics. 2007;8:597-608.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL. Corrêa-Oliveira R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol. 2009; 128: 87-95.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Vale AM. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi. Veterinary immunology and immunopathology. 2006; 112(3-4): 102–16.

Reithinger R, Dujardin J-C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. J Clin Microbiol. 2007; 45(1): 21-5.

Riboldi E, Carvalho F, Romão PRT, Barcellos RB, Bello GL, Ramos RR, Dallegrave E. Molecular Method Confirms Canine Leishmania Infection Detected by Serological

Methods in Non-Endemic Area of Brazil. The Korean Journal of Parasitology. 2018; 56(1): 11–19

Rocha MBM. Investigação epidemiológica da leishmaniose visceral no município de Sobral, Ceará de 2014 a 2018. SANARE. 2020;19(1):18-25. doi: 10.36925/sanare.v19i1.1283

Rodrigues EHG, Rodrigues EHG, Felinto de Brito ME, Mendonça MG, Werkhäuser RP, Coutinho EM, Souza WV, Abath FG. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in a area of endemicity in northeastern Brazil. Journal of Clinical Microbiology. Washington. 2002; 40(10): 3572-3576.

Rodrigues EH, da Silva Soares FC, Werkhäuser RP, de Brito MEF, Fernandes O, Coutinho Abath FG. The compositional landscape of minicircle sequences isolated from active lesions and scars of American cutaneous leishmaniasis. Parasites & Vectors, London. 2013;6(1): 1-7.

Rodrigues ACM, Melo ACFL, Júnior ADS, Franco SO, Rondon FCM, Bevilaqua CML. Epidemiologia da leishmaniose cisceral no município de Fortaleza, Ceará. Pesq. Vet. Bras. 2017; 37(10):1119-24.

Rolim F, Carvalho FLN, Bello GL, Gehlen M, Halon ML, Lemos RR, et al. Leishmaniose Visceral Canina: Detecção de DNA em Soro por PCR em Tempo Real. Rev Iniciaç Cient ULBRA. 2016;14:36-46.

Ruskova L, Raclavsky V. The potential of high resolution melting analysis (hrma) to streamline, facilitate and enrich routine diagnostics in medical microbiology. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2011;155:239-52.

Sales KGS, Miranda DEO, Costa PL, Silva FJ, Figueredo LA, Brandão-Filho SP, Dantas-Torres F. Home sweet home: sand flies find a refuge in remote indigenous villages in north-eastern Brazil, where leishmaniasis is endemic. Parasite. Vectors. 2019; 12(118).

Santos EA, Sternberg C, Almeida RT. Influência da temperatura ambiente na análise do termociclador. In XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica. 2014 n.[s/n]: 1522-1525.

Santos JM, Dantas-Torres F, Mattos MR, Lino FR, Andrade LS, Souza RC, et al. Prevalence of antiLeishmania spp antibodies in dogs from Garanhuns, in the middle scrub zone (Agreste) of Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop. 2010; 43(1): 41-5.

SÃO PAULO. Grupo de Vigilância Epidemiológica. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral segundo LPI e ano de notificaçã o, Estado de São Paulo, 2014 a 2017. São Paulo: SP; 2018.

Secretaria de Estado da Saúde (SES, 2022a). Superintendencia de Controle de Endemias. Vetores. 2022. Acesso 06 de junho 2022. Disponível em: https://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/leishmaniose-visceral/vetores.

Secretaria de Estado da Saúde (SES, 2022b). Superintendencia de Controle de Endemias. Doenças. 2022. Acesso 06 de junho 2022. Disponível em: https://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/leishmaniose-visceral/doenca

Secretaria de Estado da Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana: Situação Atual. São Paulo: SUCEN; 2017. Acesso 06 junho 2022. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controledeendemias/programas/leishmaniose-tegumentar-americana/situacao-atual.

Sevá ADP, Mao L, Galvis Ovallos F, Tucker Lima JM, Valle D. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(2):e0005353.

Silva, Angélica Olivino da. Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA alvo da reação em cadeia da polimerase na detecção de Leishmania (Viannia) spp / Angélica Olivino Silva. - Recife: [s.n.], 2017.
Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Fiuza VO, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2001; 96(3): 285-291.

Silva EM, Alves LC, Guerra NR, Farias MP, Oliveira EL, de Souza RC, da Cunha C, Ramos RA, Porto WJ. Leishmania spp. in Didelphis spp. from Northeastern Brazil. J. Zoo Wildl. Med. 2016; 47: 942–944.

Silva SM. Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) chagasi (cunha & chagas, 1937), submetidos a um protocolo terapêutico em clínica veterinária de Belo Horizonte [Dissertação]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais, Setor de Parasitologia; 2007.

Singh N, Curran MD, Rastogil AK, Middleton D, Sundar S. Diagnostic PCR with

Leishmania donovani specificity using sequences from the variable region of kinetoplast minicircle DNA. Tropical medicine & international health. 1999; 4(6): 448-453.

Shimabukuro PHF, da Silva TRR, Fonseca FOR, Baton LA, Galati EAB. Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. Parasites & vectors. 2010;3(1):1-12.

Schuster FL, Sullivan JJ. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. Clin Microbiol Rev. 2002;15(3):374-89.

Souza NP, Almeida ABPF, Freitas TPT, Paz RCR, Dutra V, Nakazato L, et al. Leishmania (Leishmania) infantum chagasi em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(3):333-5.

Svobodová M, Volf P, Votýpka J. Transmissão experimental de Leishmania tropica para hyraxes (Procavia capensis) pela picada de Phlebotomus arabicus. Micróbios Infectam. 2006; 8: 1691–4.

Stellman SD. Book review: Epidemiolgy, L. Gordis, Fourth ed, 2009, Saunders. Prev Med. 2010; (50): 310-1.

Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of Leishmania infantum DNA in dogs. J Infect Dis. 2004; 189: 1729–33.

Szklo M. Epidemiologia translacional: algumas considerações. Epidemiologia e Serviços de Saúde. 2015; 24: 161-172.

Talmi-Frank D, Nasereddin, A, Schnur LF, Schönian G, Töz SO, Jaffe CL, Baneth G. Detection and Identification of Old World Leishmania by High Resolution Melt Analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(1): e581.

Taniguchi HH. Dinâmica de circulação de Leishmania spp. no ambiente enzoótico de duas regiões do Estado de São Paulo. [Tese]. Universidade de São Paulo – USP; 2010.

Tempone AJ, Pitaluga NA, Traub-Cseko YM. Parte III – Aspectos Bioquímicos e Moleculares na Interação Parasito-Hospedeiro- Vetor- Aspectos Moleculares da Interação Flebtomíneo-Leishmania. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2014:159.

Tenório MS, Oliveira e Sousa L, Alves-Martin MF, Paixão MS, Rodrigues MV,

Starke, Buzetti WA, Araújo Junior JP. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. Vet Parasitol. 2014; 203(1-2):203-6.

Tirlens AGM, Hellemondd JJ. Differences in energy metabolismo between Trypanosomatidae. Parasitol Today. 1998;14(7):265-71.

Thompson RC. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. Int J Parasitol. 2013; 43(12–13): 1079–1088. pmid:23892130

Tryphomas L, Zawdzka Z, Bernard MA, Janzen EA. Visceral leishmaniasis in a dog: Clinical hematological and pathological observations. Can. J. Comp. Med. 1977; 41: 1-12.

Thomaz-Soccol V, Castro EA, Navarro IT, Farias MRD, Souza LMD, Carvalho Y, Luz E. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 2009; 18: 46-51.

Tokuda Y, Nakamura T, Satonaka K, Maeda S, Doi K, Baba S, Sugiyama T. Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde. J. Clin. Pathol. 1990; 43: 748-751.

Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H. Leishmania spp. and/or Trypanosoma cruzi diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol. 2009; 164(2-4): 118-123

Ursine RL, Dias JVL, Morais HÁ, Pires HHR. Human and canine visceral leishmaniasis in na emerging focus in Araçuaí, Minas Gerais: spatial distribution an socio-environmental factors. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2016; 111(8):505-11.

Vale ECS do, Furtado T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. In: Anais Brasileiro de Dermatologia. 2005; 80(4).

Valente DC, Marcos CF. "Análise geoespacial da leishmaniose tegumentar americana no estado de são paulo: uma contribuição à geografia da saúde." Estudos Geográficos: Revista Eletrônica de Geografia. 2021;19(3):268-285.

Veja-Lopez F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis. 2003; 16:97-101.

Vossen RHAM. et al. High-Resolution Melting Analysis (HRMA) – more than just sequence variant screening. Human Mutation, New York. 2009;30(6):860-866.

Weigle KA, Valderrama L, Arias AL, Santrich C, Saravia NG. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. Am J Trop Med Hyg 1991; 44: 260–271.

Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, Wilson ME. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of Leishmania spp. in human samples. Journal of clinical microbiology. 2011; 49(11): 3892-3904.

Werneck GL. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo? Cad Saude Publica. 2016;2(6):eED010616.

White H, Potts G. Mutation scanning by high resolution melt analysis. Evaluation of RotorGeneTM 6000 (Corbett Life Science), HR1TM and 384 well LightScannerTM (Idaho Technology). Technology Assessment. National Genetics Reference Laboratory (Wessex), Salisbury, UK; 2006.

World Health Organization (WHO, 2010). Control of the Leishmaniasis: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva, technical report series, no. 949. 2010:187pp.

World Health Organization (WHO,2019). Leishmaniose [Internet]. Geneva: WHO; 2019. Acesso em 05 setembro 2019. Disponível em: https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis#.

World Health Organization (WHO, 2019). Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap. Acesso 25 janeiro 2022. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9635-401-419

World Health Organization (WHO, 2020a). Acesso em: 06 de junho de 2022. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525.

World Health Organization (WHO, 2020b). Leishmaniasis. Acesso em: 06 de setembro de 2022. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1.

World Health Organization (WHO, 2022). Leishmaniasis. Acesso 25 janeiro 2022. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis

Xiao-SU H, Wen-Tian Y, Hong-Gang L, He-Ping Y, JIan-Ping C, Ying M, Bao-Qian J, Tao Z. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of Leishmania donovani for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. J. Parasitol. 2000; 86: 822-826.

Zampieri RA, Laranjeira-Silva MF, Muxel SM, Stocco de Lima AC, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. High resolution melting analysis targeting hsp70 as a fast and efficient method for the discrimination of Leishmania species. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0004485.

Zampieri RA. Discriminação de organismos do gênero Leishmania por análises de perfis de dissociação em alta resolução (HRM – High Resolution Melting). [Tese]. Instituto de Medicina Tropical, IMT-USP, Brasil. 2019.

Zorzetto R. Uma doença anunciada. Infecção letal causada por parasita de uma só célula, a leishmaniose visceral avança sobre as cidades brasileiras. Pesquisa Fapesp, São Paulo. 2008;151:47-51.

Manuscrito

Manuscrito

Experimental Parasitology

Molecular evaluation of Leishmania spp. and its implications for public health in the state of São Paulo, Brazil.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Protozoan parasites
Keywords:	Leishmaniasis; Molecular Diagnosis; High Resolution Melting.
Corresponding Author:	Aghata Regina de Oliveira Alves-Palmeira, Master Adolfo Lutz Institute BRAZIL
First Author:	Aghata Regina de Oliveira Alves-Palmeira, Master
Order of Authors:	Aghata Regina de Oliveira Alves-Palmeira, Master
	Lorena Santos Cruz
	Lais Yamada Doretto
	Helena Hilomi Taniguchi
	José Roberto Tolezano
	Virgínia Bodelão Richini-Pereira
Abstract:	Visceral Leishmaniasis is a zoonosis infection caused by Leishmania genus, is a neglected disease and a serious public health problem that causes social and economic damage in tropical and subtropical countries. This study aimed to investigate the prevalence of Leishmania spp. in samples of canine and wild animals, from the state of São Paulo through primary growth and isolation of the parasite in hemoculture; Rapid immunochromatographic test (TR); enzyme immunoassay – ELISA/EIE; Conventional Polymerase Chain Reaction (cPCR), Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR); high resolution DNA dissociation analysis (HRM) and later genetic sequencing to identify the species not discriminated in the HRM; 180/191 (94%) canine samples and 11/191 (6%) wild samples were analyzed. Thirty-two samples were cultured, and promastigote forms were observed in one (3%) canine sample in blood culture. All canine samples were reactive in TR and ELISA. Molecular detection in the cPCR technique using LINR4/LIN19 primer, amplified 151/191 (79%) samples, while qPCR amplified 72/191 (48%) samples using HSP70F/R primer. By means of the HRM technique using amplicon 1, 55/191 (76%) samples were discriminated as Leishmania infantum . The results of this research showed the identification of the Leishmania infantum species in 53/180 (29%) samples from domestic dogs, and 2/11 (18%) samples from wild animals. Thus, the establishment of optimized protocols for the detection and identification of the causative agents of leishmaniasis becomes extremely useful for epidemiological studies.

Anexos

Anexos

Anexo 1

Procedimento para realização do teste imunoenzimático – EIE - Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante:

- ✓ Os componentes do kit armazenados na temperatura 2°C a 8°C, assim como os componentes armazenados na temperatura -20°C, soros controles, strips sensibilizados, devem ser retirados de sua temperatura de conservação antes do início do teste e utilizados, retornando-os à temperatura logo após o uso.
- ✓ O conjugado deve ser retirado de sua temperatura de conservação apenas no momento da sua utilização, sem a necessidade de descongelamento retornando para conservação imediatamente, após o uso.
- ✓ Preparo do diluente de amostras/conjugado:

nº Strips	nº reações	Diluente de amostras/conjugado 5x	Lecitina de leite (pesar)	Água destilada
01	Até 16	3ml	0,3g	12ml
02	Até 32	6ml	0.6g	24ml

- ✓ Diluir em tubos 5µl dos controles e das amostras de soros ou plasmas de cães a serem analisadas, previamente homogeneizadas, em 500µl do diluente de amostra/conjugado (1:100).
- ✓ Distribuir na placa sensibilizada, 100µl dos controles e amostras já diluídos, da seguinte forma:

CP
CP
CN
CN
CN
SS
SS
Amostra

CP= controle positivo; CN = controle negativo; SS=sem soro

- ✓ Tampar as placas e incubar a 37°C ±1°C por 30 minutos.
- ✓ Preparar o tampão de lavagem: Obs: este tampão é sujeito a cristalização, caso isso ocorra, coloque em banho-maria a 37°C até a dissolução dos cristais.
- ✓ Volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

nº Strips duplas	nº placas	Tampão de Lavagem (20x)	Água destilada
Até 03	1/2	20ml	380ml
Até 06	1	25ml	475ml

- ✓ Destampar cuidadosamente a placa, aspirar o conteúdo e lavar 6 vezes com tampão de lavagem. Aguardar 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

- ✓ Diluir o conjugado no diluente de amostra/conjugado, preparando anteriormente.

- ✓ Preparo do conjugado:

nº Strips	nº reações	Diluente de amostras/conjugado diluído	Conjugado
01	Até 16	5ml	5µl
02	Até 32	5ml	5µl

- ✓ Homogeneizar bem e distribuir 100µl da diluição do conjugado em cada orifício dos strips.
- ✓ Tampar as placas e incubar a 37ºC ±1ºC por 30 minutos. Aspirar e lavar conforme descrito anteriormente.
- ✓ Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro (ao abrigo da luz). nº Strips duplas nº placas Tampão de Lavagem (20x) Água destilada Até 03 1/2 20ml 380ml Até 06 1 25ml 475ml nº Strips nº reações Diluente de amostras/conjugado diluído Conjugado 01 Até 16 5ml 5µl 02 Até 32 5ml 5µl 107
- ✓ Preparo do substrato:

nº Strips duplas	nº reações	Diluente substrato	Cromógeno (TMB)	Substrato H2O2
01	Até 16	2,5ml	25µl	5ml
02	Até 32	4ml	40µl	8ml

- ✓ Distribuir 100µl do substrato rapidamente em todos os orifícios.
- ✓ Deixar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos.
- ✓ Bloquear a reação adicionando 50µl de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, proceder a leitura das microplacas.

- ✓ Ligar o espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro 450nm para leitura e sem a utilização de filtro de referência (620-630nm).

- ✓ Para o cálculo do cut-off (CO) deve-se calcular a média das densidades óticas (DO) dos controles negativos dentro da faixa cinza de validação do teste. Caso seja encontrada alguma densidade ótica for da faixa de validação do teste, esta deverá ser descartada e a média deverá ser realizadas utilizando-se das demais densidades óticas.

- ✓ Validação do teste: Controle Positivo ≥0,500 de DO Controle Negativo ≥0,050≤0,120 de DO

Cálculo CO= média dos controles negativos X 2 Faixa cinza= CO x 1,2

Amostras Não Reagentes	Faixa Cinza	Amostras Reagentes

Anexo 2

Meio de cultura NNN (Novy, McNeal, Nicolle)

Reagentes:

Ágar	1,4g	3,37g	5,62g
NaCl	0,6g	1,48g	2,47g
Sangue	15 ml	30 ml	50 ml
H2O Milli-Q	100 ml	225 ml	375 ml

Preparo:

1. Diluir o sal e Agar base na Água Milli-Q em um erlenmeyer.
2. Tampar o mesmo com “boneca hidrófobo, papel laminado e papel rosa.
3. Autoclavar a 120ºC por 15 minutos.
4. Colocar junto na autoclave, pipetas para distribuir o meio e tubos NNN.
5. Inativar o sangue a 56ºC por 30 minutos.
6. Após autoclave do Agar, deixar o mesmo sobre a bancada até atingir temperatura de 48-52°C.
7. Ligar o fluxo, fazer a limpeza adequada e colocar todo o material na UV por 15 minutos.
8. Pipeta, tubos NNN, Agar e o sangue.
9. Ou realizar o procedimento na bancada próximo ao bico de bunsen.
10. Fazer a limpeza adequada da bancada.
11. No momento da pipetagem, evite falar. Desta maneira evitamos a contaminação do meio.
12. Pipetar 5 mL em cada tudo.
13. Inclinar os tubos sob uma pipeta de 1 mL para a polimerização, para que formem um bizel até o final do tubo.
14. Fazer controle de esterilidade: 48h
15. Após, embrulhar os tubos com papel alumínio e papel rosado.
16. Guardar sob refrigeração até o momento de uso.

Anexo 3

Meio de cultura LIT (Liver Infusion Tryptose).

1. Preparar 250mL do meio, acrescentar em Kitassato estéril, 2g de Na2HPO4, 1g de NaCl, 0,1g de KCl e 44,5mL de Água Milli-Q®.
2. Inserir ao Kitassato, um filtro de aço (Millipore®), com membrana de 22µm de poro (Millipore®).
3. Autoclar a solução junto ao filtro por 15 minutos à 121ºC.
4. Em um Erlenmeyer de 250mL, dilui-se 0,75 g de infusão de fígado (Difco TM), 0,5 g de Dextrose (Oxoid®) e 1,25 g de Triptose (Vetec®) em 100mL de água.
5. Ajusta-se o pH para 7,4. Filtrar esta solução no Kitassato, acoplando-se ao mesmo uma bomba à vácuo.
6. Após a filtragem acrescentar, em capela de fluxo laminar, 5,5mL de hemoglobina bovina à 2,2% (BBLTM), 30mL de soro fetal bovino à 11% (Nutricell®) e 1mL (20mg) de gentamicina (Gentocin®) e distribui-se 40mL em tubos rosqueados estéreis.
7. Realizar controle de esterilidade por 48 horas em estufa à 37ºC, utilizando caldo BHI (Brain Heart Infusion).
8. Após o controle de esterilidade, os tubos são mantidos em refrigeração de 2-8ºC até o momento de uso.
9. Guardar os tubos na BOD 25°C e fazer a 1ª leitura após 7 dias.

Anexo 4

Cultura (*Leishmania)* NNN + LIT

- ✓ Retirar o meio NNN e LIT da geladeira.
- ✓ Colocar por 20 minutos na estufa antes de usar.
- ✓ Limpar o fluxo com álcool 70% e em todo material.
- ✓ Colocar água, sabão e hipoclotito no descarte.
- ✓ Colocar todo o material que for utilizar dentro do fluxo.
- ✓ Luva, Pipeta Pasteur, amostras, parafilme, NNN, LIT e grades.
- ✓ Ligar UV por 30 minutos.
- ✓ Pipetar 5ml do LIT no NNN.
- ✓ Homogeneizar e pipetar de 0,5ml a 1 ml da amostra no meio NNN+LIT.
- ✓ Vedar o meio com o parafilme e homogeineizar.
- ✓ Guardar os tubos na BOD 25°C e fazer a 1ª leitura após 7 dias.

Anexo 5

Leitura de cultura (*Leishmania)*

- ✓ Limpar o fluxo com álcool 70%
- ✓ Colocar lâmina e lamínula.
- ✓ Lligar luz UV por 15 minutos.
- ✓ Retire a cultura de *Leishmania* da BOD 25°C e coloque no fluxo.
- ✓ Pipetar 10 ul da amostra na lamínula e colocar a lamínula por cima.
- ✓ Realizar a leitura na lâmina de formas promastigota de *Leishmania* no aumento 400x.

Anexo 6

Preparo das culturas para extração de DNA

O material biológico semeado em cultura foi preparado para extração de DNA após o término das leituras.

Foi realizado a centrifugação e várias lavagens com PBS pH7,4, a fim de concentrar os parasitos, conforme Pinto et al., (2000).

Anexo 7

Protocolo de extração de DNA para pesquisa de *Leishmania* spp. em amostras de soro ou sangue total utilizando o kit de extração Kit Illustra blood genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare, Pittsburgh, EUA).

- ✓ Ligar fluxo por 30 minutos na luz ultra-violeta e colocar os materiais a serem utilizados.
- ✓ Em microtubos identificados de 1,5 ml acrescentar 20µl de proteinase K (20mg/mL) e 200µL soro ou sangue total.
- ✓ Homogeneizar em agitador (vortex) por 10 segundos.
- ✓ Acrescentar 400µL de tampão de lise (lysis buffer).
- ✓ Incubar por 10 minutos, em temperatura ambiente, no agitador (vortex);
- ✓ Centrifugar a 11.000 G por 30 segundos a 1 minuto, para decantação de detritos.
- ✓ Colocar coluna no tubo coletor, identificar e aplicar toda a amostra na coluna GFX.
- ✓ Centrifugar a 11.000 G por 1 minuto e desprezar o sobrenadante do tubo coletor.
- ✓ Aquecer a 70°C o tampão de eluição (elution buffer).
- ✓ Acrescentar 500µL de tampão de lise (lysis buffer) na coluna GFX, centrifugar 11000 G por 1 minuto e desprezar o sobrenadante do tubo coletor.
- ✓ Acrescentar 500µL de tampão de lavagem (wash buffer) na coluna GFX, centrifugar 11000 G por 3 minuto e desprezar o tubo coletor.
- ✓ Colocar a coluna GFX em um microtubo de 1,5mL (DNAse-free) identificado;
- ✓ Adicionar 200µl do tampão de eluição (elution buffer) diretamente na matriz da coluna GFX.
- ✓ Incubar por 1 minuto, em temperatura ambiente.

- ✓ Centrifugar a 11.000 G por 1 minuto.
- ✓ Obtém-se a amostra de DNA a qual foi armazenada à -20 °C em freezer.

Anexo 8

Contagem de cultura (*Leishmania)* – Protocolo Câmara de Newbauer

Preparo de cultura para curva padrão de qPCR.

- ✓ Limpar o fluxo com álcool 70%
- ✓ Colocar lâmina, lamínula e a câmara de Newbauer.
- ✓ Lligar luz UV por 15 minutos.
- ✓ Retire a cultura de *Leishmania* da BOD 25°C e coloque no fluxo.
- ✓ Pipetar 10 ul da amostra entre a lamínula e a câmara.
- ✓ Realizar a contagem dos parasitos nos 5 quadrantes na diagonal superior e diagonail inferior.
- ✓ Fazer a média da somatória de cada quadrante.

$$\frac{\text{Média}}{\textbf{Diluição x 5/25 x h câmara}} = \textbf{X parasitos/ul}$$

- ✓ **C1.V1=C2.V2 → Usar concentração final 10^5.**
- ✓ Realizar a extração de DNA e fazer diluição seriada até 10^0.

Anexo 9

Quantificação de DNA das amostras extraídas utilizando o quantificador Biotech Epoch®, EUA.

- ✓ Calibrar o aparelho utilizando 2µL de água ultrapura nas cavidades de leitura indicadas no aparelho.
- ✓ Após a calibração acrescentar 2µL de cada amostra de DNA para leitura de quantificação.

Ácidos nucleicos absorvem luz à 260nm (comprimento de onda eletromagnética), enquanto proteínas absorvem luz à 280nm. A estimativa de pureza de DNA na amostra é verificada pela relação de absorbância 260/280. Valores dessa relação entre 1,8 a 2,0 são considerados ótimos para DNA. Valores abaixo de 1,8 podem indicar excesso de proteínas.

Anexo 10

Protocolo utilizado para purificação dos amplicons para sequenciamento genético, com uso da enzima ExoSap (GE)- USB ExoSap-IT (USB Affymetrix, USA).

A ExoSAP-IT® é composta por enzimas hidrolíticas, a exonuclease I e a alcalina fosfatase de camarão (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP). Enquanto a exonuclease I remove os resíduoes de *primer* na solução, a SAP é responsável por quebrar as bases (DNTPs) que não se ligaram durante a PCR.

- ✓ Acrescentar 04 µL da enzima ExoSap-IT® e 10µL do produto da PCR no microtubo de 0,2mL.
- ✓ Colocar o microtubo no termociclador e submeter ao perfil de ciclagem de acordo com o protocolo do fabricante: 37 °C - 1 hora e 80 °C - 15 min.
- ✓ Após a ciclagem, fazer a quantificação do DNA das amostras.
- ✓ Se a quantificação apresentar valores altos (superior a 200ng/µL), acrescentavase água mili-Q e realizar nova quantificação.
- ✓ Em microtubos de 0,2mL livres de DNAses e RNAses acrescentar 5µL de cada um dos *primer*s, (Sense e Anti-sense), sendo que cada *primer* tem concentração de 5pmol/µL.
- ✓ Acrescentar 10µL da amostra em cada microtubo com *primer*s.
- ✓ Estocar em temperatura ambiente até a realização do sequenciamento

Apêndices

Apêndices

Apêndice 1

Quantificação de DNA por espectofotometria

Quantificação do DNA			
Nº da amostra	Material biológico	Concentração DNA Parasito/ul	Relação 260/280
1	Lesão	2,117	2,5
2	Lesão	3,087	2,3
3	Aspirado baço	15,168	1,8
4	Aspirado baço	8,489	2,3
5	Aspirado baço	1,713	2,3
6	Aspirado baço	4,729	3,5
7	Aspirado baço	3,743	2,2
8	Aspirado baço	3,906	2,0
9	Aspirado baço	4,394	1,9
10	Aspirado baço	2,807	1,8
11	Aspirado baço	1,896	1,8
12	Aspirado baço	2,397	2,1
13	Aspirado baço	3,067	1,7
14	Aspirado baço	4,335	1,7
15	Aspirado baço	1,696	1,8
16	Aspirado baço	3,077	2,3
17	Aspirado baço	3,961	2,2
18	Aspirado baço	3,699	2,4
19	Aspirado baço	3,291	2,7
20	Aspirado baço	4,095	2,3
21	Aspirado baço	5,3	2,2

22	Aspirado baço	4,257	2,4
23	Aspirado baço	5	2,8
24	Aspirado baço	3,667	2,4
25	Aspirado baço	3,645	1,8
26	Aspirado baço	5,279	2,6
27	Aspirado baço	4,936	2,3
28	Aspirado baço	5,35	2,0
29	Lesão	5,571	2,7
30	Lesão	3,652	2,8
31	Aspirado fígado e baço	278,121	2,0
32	Fígado	160,083	2,1
33	Aspirado fígado e baço	1,351	1,9
34	Baço	240,844	2,1
35	Aspirado baço	94,376	2,3
36	Aspirado fígado e baço	72,387	2,0
37	Aspirado fígado e baço	279,857	2,1
38	Baço	238,798	2,3
39	Fígado	74,748	2,2
40	Fígado	172,637	2,1
41	Fígado	225,649	2,3
42	Aspirado baço	4,082	3,1
43	Lesão	4,246	2,1
44	Lesão	1,916	2,5
45	Lesão	2,58	2,0
46	Aspirado baço	3,352	2,2
47	Aspirado baço	3,138	1,3
48	Aspirado baço	3,67	1,8
49	Aspirado baço	3,702	2,8
50	Aspirado fígado e baço	2,363	1,8
51	Aspirado baço	4,727	1,0
52	Aspirado baço	7,587	2,0
53	Aspirado baço	3,029	2,6
54	Aspirado baço	3,706	2,0
55	Aspirado baço	2,469	2,4
56	Aspirado baço	3,666	1,9

57	Aspirado baço	5,381	1,4
58	Aspirado baço	1,19	1,8
59	Aspirado baço	3,033	2,3
60	Aspirado baço	3,897	1,4
61	Aspirado baço	3,27	1,5
62	Aspirado baço	2,778	2,4
63	Aspirado baço	4,223	2,4
64	Aspirado baço	2,098	2,0
65	Aspirado baço	2,914	1,5
66	Aspirado baço	3,415	1,8
67	Aspirado baço	5,608	1,9
68	Aspirado baço	2,957	2,9
69	Aspirado baço	3,919	1,8
70	Aspirado baço	3,578	2,0
71	Aspirado baço	3,026	2,9
72	Aspirado baço	1,001	2,8
73	Aspirado baço	2,913	2,4
74	Aspirado baço	3,59	2,9
75	Aspirado baço	11,059	1,2
76	Aspirado baço	3,706	2,6
77	Aspirado baço	11,429	2,1
78	Aspirado baço	2,08	2,8
79	Aspirado baço	3,093	1,9
80	Aspirado baço	5,68	2,2
81	Aspirado baço	4,751	1,6
82	Aspirado baço	5,547	1,7
83	Aspirado fígado e baço	2,585	1,9
84	Aspirado fígado e baço	18,134	1,9
85	Aspirado fígado e baço	3,719	1,9
86	Aspirado fígado e baço	1,964	2,1
87	Aspirado fígado e baço	10,601	3,3
88	Aspirado fígado e baço	6,205	2,9
89	Aspirado fígado e baço	2,941	1,8
90	Aspirado fígado e baço	2,088	2,2
91	Aspirado fígado e baço	0,989	2,1

92	Aspirado fígado e baço	34,571	2,9
93	Aspirado fígado e baço	2,909	1,8
94	Aspirado fígado e baço	2,199	2,0
95	Aspirado fígado e baço	0,913	1,9
96	Aspirado baço	2,836	2,7
97	Aspirado baço	2,817	1,8
98	Aspirado baço	3,469	3,4
99	Aspirado baço	6,839	2,2
100	Aspirado baço	3,328	2,2
101	Aspirado baço	3,218	1,7
102	Aspirado baço	3,783	2,5
103	Aspirado baço	6,508	2,3
104	Aspirado baço	6,49	2,0
105	Aspirado baço	3,004	2,5
106	Aspirado baço	2,929	3,2
107	Aspirado baço	3,025	2,2
108	Aspirado baço	3,685	1,8
109	Aspirado baço	26,286	1,1
110	Aspirado baço	6,951	2,3
111	Aspirado baço	8	1,1
112	Aspirado baço	7,837	2,6
113	Aspirado baço	3,131	2,6
114	Aspirado baço	3,51	1,1
115	Aspirado baço	2,363	2,6
116	Aspirado baço	4,014	2,2
117	Aspirado baço	3,877	1,6
118	Aspirado baço	0,953	-2,5
119	Aspirado baço	5,142	0,6
120	Aspirado baço	2,928	1,8
121	Aspirado baço	7,294	0,8
122	Aspirado baço	1,043	1,8
123	Aspirado baço	3,92	2,3
124	Aspirado baço	3,093	1,8
125	Aspirado baço	4,123	2,1
126	Aspirado baço	0,865	2,9

127	Aspirado baço	4,494	2,2
128	Aspirado baço	1,646	2,4
129	Lesão	22,187	2,2
130	Lesão	3,336	2,4
131	Aspirado fígado e baço	3,49	1,9
132	Aspirado fígado e baço	4,822	2,7
133	Aspirado fígado e baço	2,099	2,2
134	Aspirado fígado e baço	2,478	1,8
135	Aspirado fígado e baço	2,761	1,9
136	Aspirado fígado e baço	7,91	2,2
137	Aspirado fígado e baço	1,096	2,0
138	Aspirado fígado e baço	4,856	2,5
139	Plasma	6,92	0,9
140	Plasma	9,658	1,4
141	Plasma	12,123	1,2
142	Plasma	15,588	1,1
143	Plasma	12,641	1,2
144	Plasma	9,319	1,0
145	Plasma	10,314	1,0
146	Plasma	13,718	1,1
147	Plasma	9,145	1,0
148	Plasma	12,486	1,2
149	Plasma	10,037	1,4
150	Plasma	9,429	0,9
151	Soro	39,651	0,6
152	Soro	5,548	1,2
153	Soro	2,792	1,6
154	Soro	5,777	1,1
155	Soro	2,954	1,2
156	Soro	2,888	1,4
157	Soro	1,982	1,3
158	Soro	4,237	1,3
159	Soro	3,861	1,0
160	Aspirado Linfonodo	0,543	1,8
161	Aspirado Linfonodo	0,221	1,7

162	Aspirado Linfonodo	0,154	2,0
163	Plasma	0,148	1,1
164	Aspirado Linfonodo	0,984	1,0
165	Figado	0,471	1,9
166	Baço	-0,115	2,0
167	Medula óssea	-0,133	2,5
168	Plasma	-0,496	2,5
169	Aspirado Linfonodo	0,982	0,8
170	Figado	0,852	0,3
171	Baço	0,745	2,7
172	Medula óssea	0,365	0,3
173	Plasma	0,952	1,9
174	Aspirado Linfonodo	0,478	1,8
175	Figado	0,441	1,9
176	Baço	0,884	1,8
177	Medula óssea	0,89	1,2
178	Aspirado Linfonodo	0,958	1,9
179	Figado	0,981	1,8
180	Baço	0,999	1,5
181	Medula óssea	1,025	1,2
182	Aspirado Linfonodo	1,032	1,9
183	Figado	1,086	1,3
184	Baço	1,097	1,2
185	Medula óssea	1,116	1,5
186	Aspirado Linfonodo	1,137	2,0
187	Aspirado Linfonodo	1,151	1,6
188	Aspirado Linfonodo	1,154	1,4
189	Aspirado Linfonodo	0,894	1,5
190	Aspirado Linfonodo	0,89	1,4
191	Aspirado Linfonodo	0,951	1,1

Apêndice 2

Quantificação de carga parasitária das amplificações na qPCR.

Nº da amostra	Material biológico	Ct	Carga parasitária Parasito/mL
1	Lesão	18.67	15.966,03
2	Lesão	16.17	369.207,72
3	Aspirado baço	15.59	1.097.792,00
4	Aspirado baço	17.02	304.235,94
5	Aspirado baço	28.17	0
6	Aspirado baço	18.70	15.095,33
7	Aspirado baço	21.65	79,45
8	Aspirado baço	20.09	217,86
9	Aspirado baço	20.79	57,81
10	Aspirado baço	29.55	0
11	Aspirado baço	30.41	0
12	Aspirado baço	25.91	0
13	Aspirado baço	32.45	0
14	Aspirado baço	29.85	0
15	Aspirado baço	29.39	0
16	Aspirado baço	30.77	0
17	Aspirado baço	29.42	0
18	Aspirado baço	28.46	0
19	Aspirado baço	31.29	0
20	Aspirado baço	29.45	0
21	Aspirado baço	28.96	0
22	Aspirado baço	29.05	0
23	Aspirado baço	30.43	0
24	Aspirado baço	30.89	0

25	Aspirado baço	26.93	0
26	Aspirado baço	30.03	0
27	Aspirado baço	30.92	0
28	Aspirado baço	28.39	0
29	Lesão	19.70	2.564,68
30	Lesão	22.70	12,14
31	Aspirado fígado e baço	24.59	0,42
32	Fígado	23.97	1,27
33	Aspirado fígado e baço	20.15	1.143,98
34	Baço	20.50	614,57
35	Aspirado baço	28.64	0
36	Aspirado fígado e baço	30.96	0
37	Aspirado fígado e baço	35.07	0
38	Baço	29.58	0
39	Fígado	28.37	0
40	Fígado	29.19	0
41	Fígado	32.48	0
42	Aspirado baço	29.19	0
43	Lesão	27.89	0
44	Lesão	29.22	0
45	Lesão	26.74	0,01
46	Aspirado baço	21.88	52,26
47	Aspirado baço	27.78	0,30
48	Aspirado baço	22.75	11,17
49	Aspirado baço	19.73	2.436,82
50	Aspirado fígado e baço	23.98	1,24
51	Aspirado baço	28.92	0
52	Aspirado baço	21.52	29,46
53	Aspirado baço	25.96	0,03
54	Aspirado baço	23.57	1,88
55	Aspirado baço	26.77	0,01

56	Aspirado baço	23.97	0,96
57	Aspirado baço	30.48	0
58	Aspirado baço	30.56	0
59	Aspirado baço	30.51	0
60	Aspirado baço	30.33	0
61	Aspirado baço	30.48	0
62	Aspirado baço	25.27	0,04
63	Aspirado baço	21.28	44,74
64	Aspirado baço	30.25	0
65	Aspirado baço	30.84	0
66	Aspirado baço	31.38	0
67	Aspirado baço	31.30	0
68	Aspirado baço	21.17	54,15
69	Aspirado baço	28.47	0
70	Aspirado baço	25.92	0,03
71	Aspirado baço	27.25	0
72	Aspirado baço	30.46	0
73	Aspirado baço	29.87	0
74	Aspirado baço	30.40	0
75	Aspirado baço	30.97	0
76	Aspirado baço	30.91	0
77	Aspirado baço	26.47	0
78	Aspirado baço	26.91	0,01
79	Aspirado baço	24.94	0,18
80	Aspirado baço	19.11	1.414,22
81	Aspirado baço	21.09	32,97
82	Aspirado baço	29.53	0
83	Aspirado fígado e baço	20.38	757,67
84	Aspirado fígado e baço	19.22	6.011,64
85	Aspirado fígado e baço	25.73	0,06
86	Aspirado fígado e baço	22.46	18,85

87	Aspirado fígado e baço	23.38	3,60
88	Aspirado fígado e baço	20.01	1.463,77
89	Aspirado fígado e baço	20.99	258,10
90	Aspirado fígado e baço	21.53	98,62
91	Aspirado fígado e baço	25.99	0,03
92	Aspirado fígado e baço	29.49	0
93	Aspirado fígado e baço	29.01	0
94	Aspirado fígado e baço	29.45	0
95	Aspirado fígado e baço	28.54	0
96	Aspirado baço	22.35	3,01
97	Aspirado baço	23.70	0,23
98	Aspirado baço	21.70	10,39
99	Aspirado baço	21.70	10,41
100	Aspirado baço	19.26	1.054,71
101	Aspirado baço	21.58	13,05
102	Aspirado baço	20.11	209,60
103	Aspirado baço	20.81	55,72
104	Aspirado baço	21.99	5,95
105	Aspirado baço	28.20	0
106	Aspirado baço	28.24	0
107	Aspirado baço	28.06	0
108	Aspirado baço	30.68	0
109	Aspirado baço	26.55	0
110	Aspirado baço	27.68	0
111	Aspirado baço	29.61	0
112	Aspirado baço	30.93	0
113	Aspirado baço	23.72	1,97
114	Aspirado baço	22.66	13,01

115	Aspirado baço	21.95	13,89
116	Aspirado baço	21.13	199,62
117	Aspirado baço	21.72	20,80
118	Aspirado baço	20.40	210,36
119	Aspirado baço	31.55	0
120	Aspirado baço	28.19	0
121	Aspirado baço	26.29	0,02
122	Aspirado baço	25.94	0,04
123	Aspirado baço	24.94	0,08
124	Aspirado baço	24.52	0,16
125	Aspirado baço	22.73	11,61
126	Aspirado baço	27.65	0
127	Aspirado baço	28.85	0
128	Aspirado baço	27.20	0
129	Lesão	13.20	271.664.990,00
130	Lesão	15.33	6.186.567,50
131	Aspirado fígado e baço	15.44	2.005.392,62
132	Aspirado fígado e baço	16.38	405.591,28
133	Aspirado fígado e baço	25.22	0,11
134	Aspirado fígado e baço	21.85	35,79
135	Aspirado fígado e baço	22.83	6,70
136	Aspirado fígado e baço	22.81	7,00
137	Aspirado fígado e baço	28.69	0
138	Aspirado fígado e baço	21.66	23,10
139	Plasma	30.63	0
140	Plasma	25.60	0,06
141	Plasma	30.32	0
142	Plasma	30.22	0
143	Plasma	29.33	0

144	Plasma	30.71	0
145	Plasma	30.52	0
146	Plasma	30.54	0
147	Plasma	30.92	0
148	Plasma	30.20	0
149	Plasma	30.98	0
150	Plasma	30.79	0
151	Soro	31.49	0
152	Soro	26.74	0
153	Soro	30.62	0
154	Soro	31.22	0
155	Soro	30.89	0
156	Soro	27.87	0
157	Soro	30.43	0
158	Soro	30.71	0
159	Soro	30.97	0
160	Aspirado Linfonodo	NR	NR
161	Aspirado Linfonodo	NR	NR
162	Aspirado Linfonodo	NR	NR
163	Plasma	NR	NR
164	Aspirado Linfonodo	NR	NR
165	Figado	NR	NR
166	Baço	NR	NR
167	Medula óssea	NR	NR
168	Plasma	NR	NR
169	Aspirado Linfonodo	NR	NR
170	Figado	NR	NR
171	Baço	NR	NR
172	Medula óssea	NR	NR
173	Plasma	NR	NR

174	Aspirado Linfonodo	NR	NR
175	Figado	NR	NR
176	Baço	NR	NR
177	Medula óssea	NR	NR
178	Aspirado Linfonodo	NR	NR
179	Figado	NR	NR
180	Baço	NR	NR
181	Medula óssea	NR	NR
182	Aspirado Linfonodo	NR	NR
183	Figado	NR	NR
184	Baço	NR	NR
185	Medula óssea	NR	NR
186	Aspirado Linfonodo	NR	NR
187	Aspirado Linfonodo	NR	NR
188	Aspirado Linfonodo	NR	NR
189	Aspirado Linfonodo	NR	NR
190	Aspirado Linfonodo	NR	NR
191	Aspirado Linfonodo	30.61	0

NR: Não realizado