

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

RELAÇÃO ENTRE CARGA PARASITÁRIA DE CÃES
NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE
VISCERAL E INFECTIVIDADE PARA *Lutzomyia*
***longipalpis*.**

Lílian Aparecida Colebrusco Rodas

Bióloga

ARAÇATUBA – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

RELAÇÃO ENTRE CARGA PARASITÁRIA DE CÃES
NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE
VISCERAL E INFECTIVIDADE PARA *Lutzomyia*
longipalpis

Lílian Aparecida Colebrusco Rodas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cáris Maroni Nunes
Co-orientador: Prof. Dr. David Anthony Orin Courtenay

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva).

ARAÇATUBA – SP
2014

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Rodas, Lilian Aparecida Colebrusco

R685r

Relação entre carga parasitária de cães naturalmente acometidos por Leishmaniose visceral e infectividade para ***Lutzomyia longipalpis*** / Lilian Aparecida Colebrusco Rodas. -- Araçatuba: [s.n], 2014.
89 f. il.; + CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2014.

Orientador: Prof. Dra. Caris Maroni Nunes

1. Leishmaniose. 2. Xenodiagnostico. 3 ***Leishmania infantum*** - patogenicidade 4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real I.T.

CDD 616.9364

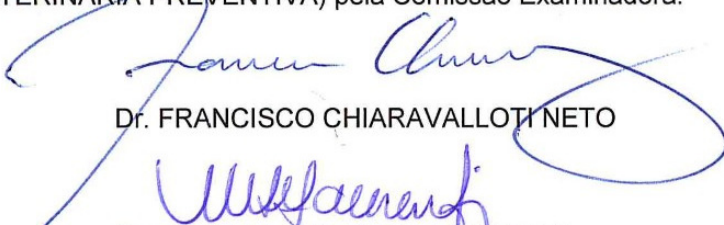
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

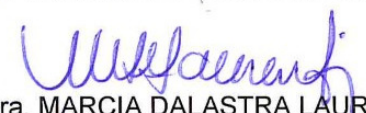
TÍTULO: Relação entre carga parasitária de cães naturalmente acometidos por
leishmaniose visceral e infectividade para Lutzomyia longipalpis.

AUTORA: LILIAN APARECIDA COLEBRUSCO RODAS

ORIENTADORA: Dra. CÂRIS MARONI NUNES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL
(MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA) pela Comissão Examinadora.


Dr. FRANCISCO CHIARAVALLOTTI NETO

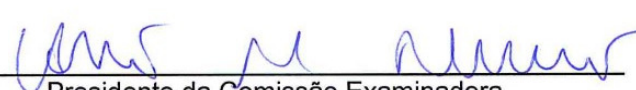

Dra. MARCIA DALASTIRA LAURENTI


Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES


Dra. MARY MARCONDES


Dra. CÂRIS MARONI NUNES

DATA DA REALIZAÇÃO: 20 de agosto de 2014.


Presidente da Comissão Examinadora
Dra. CÂRIS MARONI NUNES
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Lílian Aparecida Colebrusco Rodas, nascida no dia 25 de abril de 1963, no município de Araçatuba – SP, é Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas formada pela Universidade Estadual de Londrina (1986). Participação do Programa de Aprimoramento Profissional de Nível Superior na Área de Controle de Vetores, da Superintendência de Controle de Endemias - Secretaria de Estado da Saúde - Fundap (1990 a 1992); Especialização em Saúde Pública, pela Universidade de Ribeirão Preto (2000) e Mestrado em Ciências, Área de Concentração em Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública, pela Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde - SP (2006). Atualmente é Pesquisador Científico III da Superintendência de Controle de Endemias. Tem experiência na área de Saúde Coletiva, com ênfase em vigilância e controle de vetores, atuando principalmente nos seguintes temas: bioecologia, epidemiologia e controle de vetores.

DEDICATÓRIA

À

Meg, Speedy, Úrsula, Mel, Sandy, 4862, Lili, 4240, 4926, Maria Furacão, Duquesa, Pupi, Rajine, Rabbitio, Belinha, Juli, Babi, 4856, 4106, Charloti, Sofia, Fiona, Pirata, Negão, 25, Speed, Dunga, Rex, Neguinha, Lili, Bela, Chivas, Chiara, Nina, Laika, 36, 4569, Bili, Chaquira, Filé...

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Cárís Maroni Nunes, do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP Campus de Araçatuba, pela orientação, confiança e apoio.

Ao Prof. Dr. David Anthony Orin Courtenay, pela co-orientação, apoio, por possibilitar a realização das análises de PCR e qPCR no Laboratório de Ecologia e Epidemiologia da “School of Life Sciences”, da University of Warwick, UK.

Ao Prof. Dr. André Fernando de Oliveira, da Universidade Federal de Viçosa, pela realização das análises estatísticas, apoio e ensinamentos transmitidos.

À equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UNESP de Araçatuba e toda equipe pelo apoio, especialmente a Dandara Camila Morais Pereira, pela ajuda nos experimentos de xenodiagnósticos, atividades laboratoriais e apropriação dos dados e Carolina Aparecida Carlin Beloti na avaliação dos sinais clínicos, coleta de material biológico dos cães e atividades laboratoriais, pela dedicação e apoio em todos os momentos.

À equipe do Laboratório da “School of Life Sciences”, da University of Warwick, UK. Lidja, Mariana, Stephane, Erin Dilger pela receptividade e especialmente ao pesquisador Leonides Calvo-Bado pela acolhida, apoio e ensinamentos transmitidos para realização das análises de PCR e pela realização das análises de PCR e qPCR.

À todos os funcionários de Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Araçatuba, especialmente aos funcionários, Ocilaine

Ferreira Perez, Joice Cristina Bonfim da Silva, José Donizete dos Santos, César Aparecido dos Santos, João Barbosa de Novaes, Sérgio Lopes da Silva, Júnior Sebastião dos Santos, pelo apoio incondicional de todas as horas e pelo carinho no trato com os animais.

Aos Médicos Veterinários Saulo Vinicius Avanço e Rafael Silva Cipriano do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, pela colaboração nas atividades de avaliação dos sinais clínicos dos cães e coleta de material biológico.

À equipe de captura entomológica, Jesus César Batista, Jurandir Forcacin, Leni Alves do Nascimento, Sebastião Mendes de Abreu Sobrinho, Sílvia Valéria Marquette, pelo profissionalismo, dedicação e comprometimento com o trabalho.

À equipe do laboratório de entomologia do Serviço Regional de Araçatuba, Thaíse de Andrade Sabino, pelo apoio em todas atividades laboratoriais e experimentais e à Neusa Barbosa pela manutenção e cuidado com o material da pesquisa.

À amiga de todas as horas e colega de trabalho do laboratório do Serviço Regional de Araçatuba, Neusa Fernandes Chierici, pelo apoio, amizade, dedicação e profissionalismo com que se dedicou durante todo o desenvolvimento das atividades de campo, experimentais e laboratoriais.

À colega de trabalho e amiga, Rosemari Suto, pelo apoio administrativo e incentivo em todos os momentos.

A Diretora do Serviço Regional – 09 – Araçatuba, Clélia Moreira Martinelli, pelo apoio administrativo, amizade e incentivo em todos os momentos.

A todos os funcionários da Superintendência de Controle de Endemias, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos membros da Banca de Qualificação e Defesa, Dra. Mary Marcondes, Dr. Carlos Kaneto, Dr. Francisco Chiaravalloti Neto, Dra. Márcia Dalastra Laurenti e Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles, pelas sugestões e valiosa contribuição.

À Superintendência de Controle de Endemias, pela oportunidade oferecida, apoio administrativo e financeiro.

À Universidade de Warwick - Laboratório de Ecologia e Epidemiologia da “School of Life Sciences” pela possibilidade da realização do doutorado **sandwich**.

Ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Araçatuba, por possibilitar a realização dos experimentos de xenodiagnósticos.

À Universidade Estadual Paulista – Campus de Araçatuba – Programa de Pós graduação em Ciência Animal pela possibilidade da realização de doutorado.

À CAPES pela Bolsa de estudos recebida (processo Nº 2062/13-5) para a realização de “doutorado sanduíche” por meio do Programa Ciência sem Fronteiras.

Ao meu Fer, meu professor, amigo, companheiro, amor, pelo interesse, dedicação, paciência e sabedoria com que me ajudou nesses meses todos.

Finalmente, à minha querida família, por estarem sempre ao meu lado, meu Pai (*in memoriam*) que apesar de não estar entre nós, está sempre ao meu lado, minha Mãe, meu Fer, filhos amados, Helinho, Lorena e minha neta Dominique, Jô, Chico, Rafael, Bruna, Rodrigo, minha irmã pela ajuda e apoio nos momentos de crise, minha querida Ivone pelas palavras de incentivo, meu sogro Sr. Luiz, aos cunhados e cunhadas, enfim a todos... Obrigada pelo carinho e compreensão de sempre. Obrigada a todos vocês! Muito, muito, muito, obrigada...

SUMÁRIO

Páginas

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
INTRODUÇÃO	16
Vetor e Leishmania	18
Detecção de Leishmania spp. no inseto vetor	21
Reservatórios e Leishmania	22
Detecção de Leishmania spp. no reservatório vertebrado	24
Exame Parasitológico	24
Testes sorológicos	25
Testes moleculares	25
Xenodiagnóstico	26
OBJETIVOS	29
Geral:	29
Específicos:	29
REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO 2 – DETECÇÃO DE Leishmania spp. EM FLEBOTOMÍNEOS SUBMETIDOS A XENODIAGNÓSTICO	44
RESUMO	46
MATERIAL E MÉTODO	48
Capturas entomológicas	48
Infecção de flebotomíneos por meio de xenodiagnóstico canino	49
Avaliação laboratorial dos flebotomíneos	51
Análise estatística	53
RESULTADOS	54

Limiar de detecção e ponto de corte da qPCR.....	54
Infecção natural e pós-xenodiagnóstico de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	56
Validação dos métodos diagnósticos	57
DISCUSSÃO.....	58
CONCLUSÃO	60
AGRADECIMENTOS.....	61
REFERÊNCIAS	61
CAPÍTULO 3 - RELAÇÃO ENTRE CARGA PARASITÁRIA E SINAIS CLÍNICOS DE CÃES NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL	66
RESUMO	67
INTRODUÇÃO.....	68
MATERIAL E MÉTODO.....	69
Cães.....	69
Xenodiagnóstico.....	70
Carga parasitária dos cães.....	73
Análise Estatística	74
RESULTADOS.....	75
Infectividade para o vetor	75
Aspectos clínicos e infectividade.....	78
DISCUSSÃO.....	86
AGRADECIMENTOS.....	88
REFERÊNCIAS	89

**RELAÇÃO ENTRE CARGA PARASITÁRIA DE CÃES
NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL E
INFECTIVIDADE PARA *Lutzomyia longipalpis***

RESUMO – Leishmaniose visceral é uma doença grave que tem no cão seu principal reservatório doméstico. Algumas lacunas no conhecimento dificultam ainda mais o controle da doença. Com relação ao reservatório canino, a possibilidade de se estabelecer indicadores de infectividade ao vetor, como a carga parasitária, poderia resultar em melhor caracterização de seu papel como fonte de infecção na cadeia epidemiológica. Foram realizados xenodiagnósticos em cães acometidos de leishmaniose visceral, com subsequente avaliação da carga parasitária no hospedeiro e no vetor, utilizando-se flebotomíneos da área urbana de Araçatuba, SP. Após cinco dias do repasto, as fêmeas foram dissecadas e submetidas à avaliação parasitológica por meio da demonstração direta do parasito (DDP) e da contagem em câmara de Neubauer (NC). Fragmento de DNA de cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp. foi amplificado por meio da PCR convencional e em tempo real (qPCR), para quantificação da carga parasitária. Os cães foram avaliados para a presença de sinais clínicos e amostras de sangue, **swab** conjuntival e de pele foram colhidas e processadas por PCR e qPCR. Os resultados dos métodos diagnósticos utilizados foram correlacionados em modelo de regressão linear e a positividade de flebotomíneos foi corrigida pela positividade natural. Tanto a PCR convencional quanto a qPCR mostraram-se adequadas para a avaliação da infectividade canina. Houve correlação entre a carga de parasitos presentes na pele e no **swab** conjuntival do cão bem como com a cargas de parasitos dos flebotomíneos. Alguns sinais clínicos dos cães, pela análise de componentes principais (PCA), estiveram relacionados com a maior taxa de infecção dos vetores.

Palavras-Chave: *Leishmania infantum* – patogenicidade, Leishmaniose, Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, Xenodiagnóstico

RELATIONSHIP BETWEEN PARASITE LOAD OF DOGS NATURALLY AFFECTED WITH VISCERAL LEISHMANIASIS AND INFECTIVITY TO

Lutzomyia longipalpis

SUMMARY - Visceral leishmaniasis is a severe disease that has the dog as its main domestic reservoir. Gaps in the knowledge difficult even more the control of this disease. Regarding the canine reservoir, the possibility of establishing infectivity indicators, like the dogs parasite load, could result in better characterization of its role as source of infection in the transmission chain. Xenodiagnosis in dogs with visceral leishmaniasis were performed with subsequent parasite load evaluation of the host and the vectors, using sandflies captured in the urban area of Araçatuba, SP. After five days, the female sand flies were dissected, subjected to parasitological evaluation by the direct demonstration of the parasite (DDP) and by counting in a Neubauer chamber (NC). A kinetoplast DNA fragment of *Leishmania* spp. was amplified by conventional PCR and by qPCR to check the presence and quantification of *Leishmania* kDNA. Dogs were assessed for clinical signs and blood, skin and conjunctival swab samples were taken and tested for parasite load. The diagnostic methods tested (NC, PCR and qPCR) were correlated by linear regression and positivity results were corrected by the natural infection rate. Conventional PCR and qPCR proved to be appropriate for evaluating canine infectivity. There was a correlation between the parasite load present in the dog's skin and the conjunctive swab, as well as with the sandflies parasite loads. Principal component analysis revealed that some of the clinical signs shown by the dogs were related to a highest sandfly infection rate.

Keywords - leishmaniasis, *Leishmania infantum* – pathogenicity, Polymerase Chain Reaction in Real Time, xenodiagnosis

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é considerada um importante problema de saúde pública e uma das principais endemias parasitárias. Os protozoários causadores da LV pertencem à classe Zoomastigophorea, ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae e gênero ***Leishmania***, sendo as principais espécies no Novo Mundo a ***Leishmania (Leishmania) infantum*** *chagasi*, anteriormente denominada ***Leishmania (L.) chagasi*** - Cunha & Chagas, 1937 (GRIMALDI; TESH, 1993; LAINSON; SHAW, 1987; MAURICIO et al., 2000; SHAW, 2006).

Trata-se de uma zoonose de transmissão vetorial que ocorre em pelo menos 12 países da América Latina, sendo que o Brasil responde por 90% dos casos (ALBUQUERQUE et al., 2009).

Na década de 90 os estados brasileiros da região Nordeste foram responsáveis pela notificação de 90% dos casos. No período de 2000 a 2002 a doença se expandiu para outras regiões com consequente redução dos casos notificados (77%) nesta região (BRASIL, 2006). Em 2009, o Nordeste notificou 43,1% dos casos, a região Norte foi responsável por 19,6%, a Sudeste por 16,8%, o Centro-Oeste por 11,6%, o Sul notificou 0,03% e 8,9% de UF ignorada (BRASIL, 2014).

Os flebotomíneos da espécie ***Lutzomyia longipalpis*** são os principais vetores da ***Leishmania infantum chagasi*** no Brasil (LAINSON; RANGEL, 2005). No estado de São Paulo o vetor foi detectado em 1997 (COSTA et al., 1997), e os primeiros casos autóctones de leishmaniose visceral foram notificados em 1999 (CAMARGO-NEVES et al., 2001).

A LV ocorre em pelo menos 100 municípios do estado de São Paulo (RANGEL et al., 2013), com 2.204 casos autóctones notificados até maio de 2013 (SÃO PAULO, 2014). Observa-se a ocorrência de dois eixos de propagação da doença neste estado: um no sentido noroeste para sudeste, acompanhando a rodovia Marechal Rondon e a construção do gasoduto Bolívia-Brasil, e outro no sentido norte sul, seguindo a malha rodoviária (CARDIM et al., 2013). Os fatores relacionados com a urbanização da doença e alteração de seu padrão epidemiológico têm sido os constantes desmatamentos, os processos migratórios e o crescimento urbano desordenado (MENDES et al., 2000; RODRIGUES, 2008; SÃO PAULO, 2006).

O cão doméstico (***Canis familiaris***) é considerado o principal reservatório urbano da doença (ALVAR et al., 2004) e o seu papel na dispersão da doença adquire grande importância epidemiológica por sua proximidade com o homem. Com o objetivo de reduzir a morbimortalidade da LV humana, o Programa de Vigilância e Controle da LV no Brasil se fundamenta na detecção e tratamento precoce dos casos humanos, na redução da densidade do vetor, bem como na eliminação dos cães sorologicamente positivos (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006). A despeito disto, tem-se observado a expansão da doença no país constituindo-se o seu controle, um grande desafio para a saúde pública (MAYA-ELKOURY et al., 2008; WERNECK et al., 2008).

Alguns fatores têm sido apontados como responsáveis pela baixa efetividade das ações aplicadas ao reservatório canino, como o fato de que nem todos os cães apresentam-se doentes nos primeiros estágios da infecção, mas podem ser igualmente infectantes para o vetor, dificultando a aceitação do proprietário da indicação de eutanásia; as características dos testes diagnósticos para a detecção desses cães; a demora na eliminação dos cães infectados e a reposição dos que são eliminados. Além destes, a heterogeneidade espacial da distribuição da doença nas áreas urbanas, o tamanho da população canina e as condições socioeconômicas e ambientais, também interferem na eficácia das medidas de controle (COSTA et al., 2013; WERNECK et al., 2008).

Estas preocupações têm mobilizado uma grande parcela de pesquisadores e profissionais da saúde. Assim, alguns grupos tentaram relacionar a infectividade do cão com os aspectos da sintomatologia e da carga do parasito através de xenodiagnósticos, porém com resultados bem diversificados, talvez por se tratar de diferentes espécies de flebotomíneos e leishmânias (LAURENTI et al., 2013; MICHALSKY et al., 2007; SOARES et al., 2011; TRAVI et al., 2001) ou pelo complexo processo de interação parasito-vetor (PIMENTA et al., 1997).

Relacionar a carga de parasitos presentes em tecidos do reservatório canino com as observadas no inseto vetor, através da técnica do xenodiagnóstico, buscando entender o verdadeiro papel do reservatório na dinâmica da transmissão urbana, é fundamental para a melhoria na eficácia do controle, alvo de tantas críticas. Não menos importante é a busca por uma metodologia para o diagnóstico entomológico mais rápido e preciso, como requerem os estudos epidemiológicos.

Vetor e *Leishmania*

Flebotomíneos são pequenos dípteros de 2 a 4 mm de comprimento, extremamente pilosos, com comportamento de fácil reconhecimento por leigos, por pousar com as asas eretas e apresentar vôo curto e saltitante. São dois os gêneros de importância médica, nas Américas a ***Lutzomyia*** e no Velho Mundo o ***Phlebotomus*** (FORATTINI, 1973). Das aproximadamente 800 espécies encontradas no mundo, 480 são encontradas nas Américas do Sul e Central (AGUIAR; MEDEIROS, 2003).

No Novo Mundo, ***Lutzomyia longipalpis*** (LUTZ; NEIVA, 1912) é a principal espécie vetora da LV, embora já tenha sido observada a ocorrência do parasito em ***Lutzomyia cruzi*** no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (GALATI et al., 1997, SANTOS et al., 1998, 2003) e em ***Lutzomyia evansi*** (NUÑES-TOVAR, 1924) (TRAVI et al., 1990, FELICIANGELLI et al., 1999), na Colômbia e Venezuela.

Após o repasto infectante onde as fêmeas do flebotomíneo, com o auxílio das peças bucais curtas e rígidas rompem os tecidos do hospedeiro e ingerem o sangue (RIBEIRO, 1986), ocorre o desenvolvimento e diferenciação dos protozoários no trato digestivo do inseto vetor (KILLICK-KENDRICK, 1979).

As leishmânias foram classificadas em subgêneros de acordo com seu comportamento no trato digestório do flebotomíneo: as do subgênero ***Viannia*** são as de comportamento peripilárico e se desenvolvem no médio abdominal e na região posterior; as de comportamento suprapilárico que se desenvolvem na porção anterior ao piloro, nas regiões abdominais e torácicas do intestino médio, são as do subgênero ***Leishmania***. Um terceiro grupo de leishmânias são as que se desenvolvem na porção posterior e infectam répteis, com desenvolvimento hipopilárico (KAMHAWAI, 2006; LAINSON; SHAW, 1987).

Logo após o repasto infectante, as formas amastigotas iniciam o processo de diferenciação morfológica e funcional que lhes assegura a sobrevivência no intestino do inseto vetor. As formas amastigotas, ingeridas com o sangue se transformam em formas lentas, com flagelos curtos, denominadas promastigotas prociclicas. São as primeiras formas observadas, são separadas do intestino por um tipo de matrix peritrófica e possuem uma certa resistência às enzimas digestivas produzidas pelo inseto. Essas, se diferenciam em promastigotas nectomonas, maiores, bem mais esbeltas, com a função de escapar da matriz peritrófica e se aderir às células do epitélio intestinal. Leptomonas que, surgem das nectomonas, são formas mais curtas e submetem-se a um segundo ciclo de multiplicação no vetor. Na válvula estomacal, observam-se as formas haptomonas e metacíclicas. As haptomonas são formas precursoras das metacíclicas, de flagelo curto e que se acumulam na válvula estomacal juntamente com as formas metacíclicas, já as formas metacíclicas também acumuladas nessa região, são altamente móveis e adaptadas para a transmissão para o hospedeiro vertebrado. As promastigotas metacíclicas têm um pequeno corpo celular, um longo flagelo, se locomovem livremente sobrevivendo no hospedeiro vertebrado (KAMHAWI, 2006) (Figura 01).

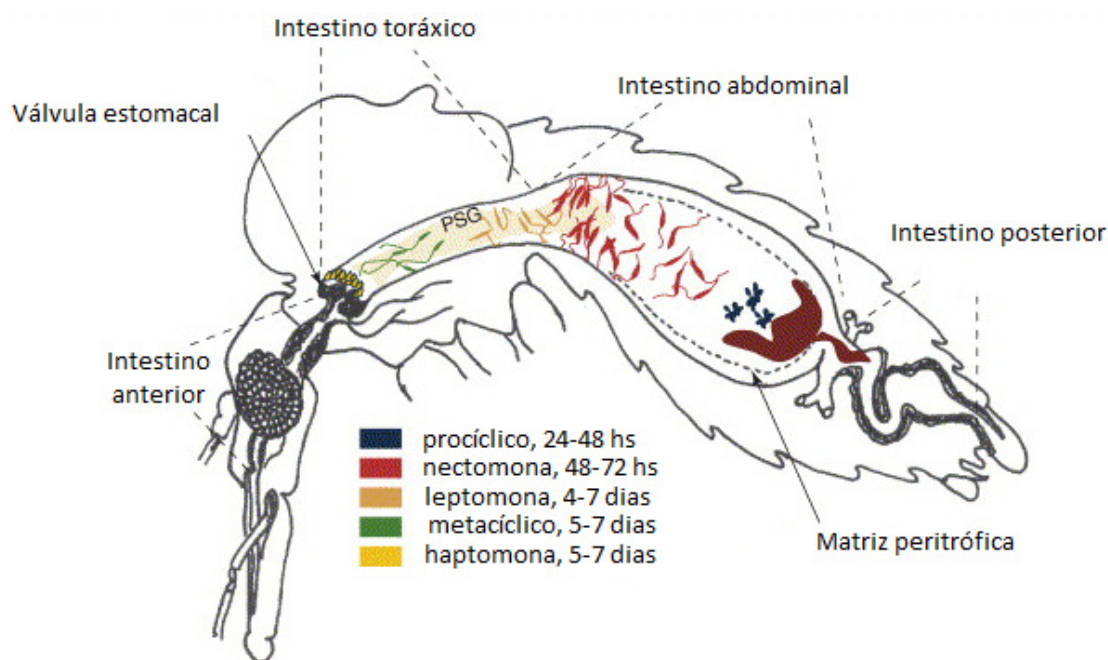


Figura 01 – Desenho esquemático do ciclo da *Leishmania* spp. no flebotomíneo.
(Adaptado de KAMHAWI, 2006)

Dentre as diferentes formas que se desenvolvem no trato digestório do vetor durante o processo de diferenciação, os protozoários metacíclicos são os que conseguem sobreviver nos vertebrados devido à presença de uma molécula de lipofosfoglicana que reveste toda a superfície celular, conferindo a essas formas, resistência à lise mediada pelo complemento (PIMENTA et al., 1992; SACKS et al., 1995).

As formas regurgitadas, as promastigotas metacíclicas, são as formas infectantes, encontradas livres, e que migram para a região anterior do tubo digestivo do inseto no momento da transmissão BLANCO et al. (2003)

O número de promastigotas regurgitados por fêmeas parece variar dependendo da espécie da *Leishmania* e do vetor. Secundino et al. (2012), trabalhando com *Lu. longipalpis* e com *Leishmania infantum chagasi*, observaram que a maioria transmitiu uma carga abaixo de 300 parasitos, em condições laboratoriais. Já Kimblin et al. (2008), avaliando *Phlebotomus duboscqui* e *Leishmania major*, observaram que 75% dos camundongos receberam dose abaixo de 600 parasitos e 25% acima de 1.000 parasitos, porém, a carga podia chegar a 100.000 protozoários, dependendo da carga parasitária da fêmea de flebotomíneo.

Detecção de *Leishmania* spp. no inseto vetor

Um parâmetro importante quando se avalia a infecção natural ou experimental de flebotomíneos por *Leishmania* é poder avaliar a intensidade da infecção e a localização das diferentes formas do protozoário no trato digestório do inseto vetor. Para tanto, a demonstração direta do parasito ainda é importante (MYSKOVA et al., 2008).

Com relação à demonstração direta do parasito (DDP), apesar de ser um método trabalhoso e requerer analistas muito bem treinados e constantes reciclagens, é possível observar a localização dessas formas no trato intestinal do inseto. A contagem em câmara de Neubauer, por outro lado, permite a quantificação e diferenciação das formas, porém, não permite conhecer sua localização. É uma técnica com restrições para insetos com baixa taxa de infecção por conta do **cut-off** de aproximadamente 60 parasitos por intestino e por conta da necessidade de uma boa homogeneização do material (MYSKOVA et al., 2008).

No trato digestório dos flebotomíneos desenvolvem-se também espécies primitivas de outros tripanossomatídeos que podem ser confundidas com as formas promastigotas de *Leishmania* sp. sendo, portanto, importante a distinção entre elas. Embora a demonstração direta tenha a vantagem de permitir a localização exata do parasito no tubo digestório do inseto e a avaliação da

metaciclologênese, não permite a distinção entre esses parasitos (SACKS et al., 1984; VOLF et al., 2004).

Em contrapartida, as técnicas moleculares com sondas específicas para a distinção das espécies facilitam os estudos entomológicos pela sua automação, alta sensibilidade diagnóstica, rapidez de execução e possibilidade de quantificação do parasito no inseto (RANASINGHE et al., 2008).

A PCR é qualitativa e útil para detecção de infecção parasitária em um grande número de insetos pela praticidade, inclusive para detecção de infecção natural em áreas de baixa endemicidade, por conta da alta sensibilidade e especificidade (CORDOBA-LANUS et al 2006; RANASINGHE et al., 2008).

A vantagem da PCR em tempo real (qPCR) é permitir a quantificação da carga parasitária, sendo muito utilizada para estudos de infecção experimental (BEZERRA- VASCONCELOS et al., 2011).

Reservatórios e *Leishmania*

No ambiente silvestre, os principais reservatórios canídeos são a raposa ***Dusicyon vetulus*** (= ***Lycalopex vetulus***) (ALENCAR, 1961; DEANE; DEANE, 1954, 1955) e a raposa ***Cerdocyon thous*** (LAINSON et al., 1969; LAINSON & SHAW 1971; SILVEIRA et al., 1982). Entre os gambás, temos o ***Didelphis albiventris*** (SHERLOCK et al., 1984) e ***Didelphis marsupialis*** (TRAVI et al., 1994).

Em 1955, Deane e Deane observaram intenso parasitismo na pele de cães e estabeleceram sua importância epidemiológica. Ainda hoje, o cão assume grande importância no meio urbano, pela proximidade com o homem e na dispersão da doença, sendo considerado o principal reservatório da ***Leishmania infantum chagasi*** (WHO, 2010).

Após a reação inflamatória provocada pela ação da saliva do flebotomíneo, durante a picada e transmissão dos protozoários para o hospedeiro vertebrado, inicia-se o desenvolvimento das leishmânias nos macrófagos, principais células hospedeiras nos vertebrados. No local da picada, uma série de reações entre o protozoário e as células do sistema imune do

hospedeiro é desencadeada para o estabelecimento e sucesso da infecção. A saliva dos flebotomíneos tem sido associada à indução da infecciosidade das leishmânias, por conta da presença de substâncias vasodilatadoras, anti-agregadoras de plaquetas, anti-hemostáticas e imunossupressoras, presentes na sua composição (KAMHAWI, 2000; SOARES; TURCO, 2003).

A infecção vai ser dependente da capacidade do macrófago em destruir ou não o parasito, dependente da ação das células Th1 e Th2. As células Th1 produzem citocinas que ativam a resposta celular mediada por células T CD4+ com produção das citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF α que controlam a infecção (MORENO e ALVAR, 2002). Já as células Th2 estimulam a resposta humoral produzindo imunoglobulinas e as citocinas IL-4, IL-5 e IL-3 que tornam o hospedeiro suscetível à infecção. Portanto, o desenvolvimento da infecção está relacionado ao aumento da resposta humoral e diminuição da resposta celular (ALVAR et al., 2004).

Os níveis das citocinas parecem variar dependendo da sintomatologia e da evolução da doença e a caracterização dessas citocinas através de técnicas moleculares pode ser importante como uma ferramenta para avaliação especialmente dos animais assintomáticos em áreas endêmicas (MANNA et al., 2006).

Uma vez infectados os cães podem ser clinicamente classificados como doentes ou subclínicos/sadios, de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos e/ou alterações clinicopatológicas, respectivamente (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Os sinais clínicos mais frequentemente observados são as lesões na pele (dermatite esfoliativa, úlceras cutâneas e alopecia), onicogribose, linfadenopatia, hiperqueratose nasal e digital, perda de peso progressiva, atrofia muscular generalizada, diminuição do apetite, letargia, esplenomegalia, lesões oculares (uveíte, conjuntivite, ceratoconjuntivite seca, blefarite) e epistaxe (ALVAR, 2004; BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Detecção de *Leishmania* spp. no reservatório vertebrado

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral em cães pode ser realizado por exames parasitológicos, após punção aspirativa e esfregaço de medula óssea, linfonodo, baço, fígado, pele ou sangue; por imunoistoquímica; pela detecção de anticorpos circulantes anti-***Leishmania***, ou por exames moleculares como a amplificação de DNA pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) (PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009).

Independentemente do exame utilizado, é necessário que se disponha de testes diagnósticos sensíveis, específicos e com alto valor preditivo para que as medidas de controle sejam desencadeadas (SCHMIDT; DUNCAN, 2003).

Exame Parasitológico

Os métodos parasitológicos baseiam-se na demonstração direta do parasito em esfregaço de amostras de tecidos como baço, medula óssea, fígado, linfonodos, mucosa intestinal e sangue periférico, mediante coloração por Giemsa, Romanovsky, Leishman ou Wright (BADARÓ; REED, 2001).

O isolamento em cultivo *in vitro* é outro método bastante utilizado para detecção do parasito em hospedeiros vertebrados, sendo os meios de cultivo mais comumente utilizados o NNN (Novy-Nicolle-McNeal) ou o LIT, MEM, Scheneider's e Evans (BADARÓ; REED, 2001).

Quanto ao isolamento em cultivo *in vivo*, as leishmânias são inoculadas no intraperitônio ou na pele de animais suscetíveis. Os hamsters da espécie BALB/c são bastante utilizados (BADARÓ; REED, 2001) e, nas formas viscerotrópicas, o resultado é observado após cerca de seis meses da inoculação, constituindo-se em método pouco prático em rotinas laboratoriais, porém, bastante útil para o diagnóstico de formas subclínicas (BADARÓ et al., 1986).

Testes sorológicos

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI), com títulos iguais ou superiores a 1:40, foi amplamente utilizada como método de triagem para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) em todo o país (BRASIL, 2006) até o ano de 2012, em inquéritos soroepidemiológicos visando à identificação do reservatório canino a ser eliminado. Tal diagnóstico era realizado com antígeno bruto de *L. major-like*, produzido pelo Laboratório Bio-Manguinhos®, com sensibilidade de 68% e especificidade de 87,5% (LIRA et al., 2006).

A partir de 2012, a triagem sorológica dos cães é feita por meio de ensaio cromatográfico que utiliza a proteína recombinante K28 (rK28) como antígeno em sistema de duplo fluxo (**Dual Path Platform** –DPP, Bio-Manguinhos®). A positividade é confirmada por ensaio Imunoenzimático (ELISA) com o kit EIE - Bio-Manguinhos®, com o antígeno solúvel de *Leishmania major-like*, que resulta em sensibilidade de 72% e especificidade de 87,5% (LIRA et al., 2006).

Testes moleculares

As técnicas moleculares PCR e qPCR têm sido usadas com diferentes oligonucleotídeos iniciadores, para identificação das espécies e quantificação do parasito em diferentes tecidos e também têm-se mostrado alternativas para o diagnóstico pela alta sensibilidade, especificidade e pela facilidade em estudos epidemiológicos (MOHAMMADIHA et al., 2013).

Os protozoários de gênero *Leishmania* possuem uma organela denominada cinetoplasto formada por moléculas de DNA agrupadas. Cerca de 95% do DNA de cinetoplasto (kDNA) é formado por minicírculos, com uma região

conservada bastante homogênea entre os representantes do mesmo gênero, sendo boas sondas moleculares (DEGRAVE et al., 1994).

Mesmo na presença do DNA do hospedeiro ou de outro agente co-infectante é possível a detecção e amplificação do agente alvo, através da PCR, desde que seja feita a escolha correta dos oligonucleotídeos iniciadores *sp* (COTRIM, 2001).

Vários oligonucleotídeos estão sendo usados, na dependência do objetivo da pesquisa e da amostra analisada: kDNA (ARANSAY et al., 2000; QUARESMA et al., 2009; RODGERS et al., 1990) RNA ribossomal (18S) (ULIANA et al., 1991) ***spliced leader mini-exon*** (SLME) (HARRIS et al., 1998), ***internal transcribed spacer*** (ITS) (ABDA et al., 2011; PARVIZI et al., 2005).

Com o desenvolvimento da PCR em tempo real (qPCR) e de sondas ***TaqMan*** (HOLLAND et al., 1991), tornou-se possível a quantificação absoluta de agentes em amostras biológicas, a partir da análise de uma curva-padrão do agente (CAVALCANTI, 2008).

Reale et al. (1999) trabalharam com amostras de sangue e aspirado de linfonodo e para amplificação de kDNA do cinetoplasto de ***Leishmania*** spp. E observaram limiar de detecção de 0,01fg de DNA.

Apesar da alta sensibilidade diagnóstica dos métodos moleculares variações podem ocorrer na dependência da amostra biológica, da metodologia da extração de DNA, dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e do tempo de infecção (MANNA et al., 2004).

Xenodiagnóstico

Trata-se de método indireto de demonstração do parasito no trato intestinal dos insetos vetores, alguns dias após estes se alimentarem de sangue do hospedeiro infectado (BRUMPT, 1914). O xenodiagnóstico pode ser útil para o isolamento do parasito, mas geralmente é mais utilizado para avaliação da

infectividade de cães em diferentes estágios da doença (MOLINA et al., 1994, QUINNELL; COURTENAY, 2009).

Apesar de extremamente trabalhoso, devido à necessidade de utilizar número grande de insetos, o xenodiagnóstico é igualmente útil para os estudos epidemiológicos, além de permitir a detecção e mensuração da carga parasitária obtida pelos insetos vetores, através da amplificação de fragmento de DNA do parasito por PCR e por qPCR (SOARES et al., 2011).

Outra utilidade do xenodiagnóstico diz respeito à avaliação da infectividade de cães com diferentes sinais clínicos, particularmente quando se considera que todos cães positivos submetidos à eutanásia, independentemente da infectividade, podendo ser repostos por um novo cão infectado, aumentando assim a força de infecção na população (NUNES et al., 2008; 2010; COURTENAY et al., 2002a; QUINNELL; COURTENAY, 2009).

Esses estudos são feitos desde a década de 30 quando Parrot et al. (1930) e Adler e Theodor (1931) trabalharam com *Phlebotomus perniciosus* e cães sintomáticos e a infectividade foi muito variável de 7,5% nos experimentos de Parrot et al. (1930) e de 32 a 65,4% nos de Adler e Theodor (1931). Rioux et al. (1972) avaliou a infectividade de cinco cães em diferentes estágios clínicos, para *P. ariasi*, e observou de 72 a 83% de infectividade, sendo que um cão assintomático não foi infectante. Gradoni et al. (1987) avaliaram dois cães, um oligossintomático com 56,4% de infectividade e outro com infecção patente, com 79,7% de infectividade. Molina et al. (1994) trabalharam com três grupos de cães classificados em sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos e observaram que a infectividade foi independente dos sintomas.

Já Costa-Val et al. (2007), diferentemente de Molina et al. (1994), observaram que cães naturalmente infectados com *L. infantum* e sintomáticos foram mais infectantes para o vetor.

Segundo Quinnell e Courtenay (2009), em estudo de meta-análise de quatro experimentos realizados no Brasil, a infectividade aumenta com a severidade clínica, porém os autores não descartam a necessidade da continuidade das ações de controle nos cães assintomáticos. Soares et al.

(2011) também observaram infectividade maior dos cães sintomáticos (13%) quando comparado aos assintomáticos (3,5%), quando avaliados pela PCR.

Já nos experimentos de Laurenti et al. (2013), a infectividade foi maior para os cães assintomáticos quando comparados aos sintomáticos, pela avaliação parasitológica.

Outro fato a ser considerado quando da avaliação por xenodiagnóstico é que a carga parasitária nos cães varia não somente nos diferentes estágios da doença, mas também nas diferentes amostras de tecidos do reservatório, seja pele, medula óssea ou sangue (MANNA et al., 2006; MANNA et al., 2004, QUARESMA et al., 2009), podendo interferir na infectividade ao inseto vetor.

OBJETIVOS

Geral:

Avaliar a infectividade de cães naturalmente infectados por ***Leishmania*** spp. e sua relação com a carga parasitária em pele, tecido conjuntival e sangue.

Específicos:

- Avaliar as características diagnósticas das técnicas de DDP, NC, PCR e qPCR em flebotomíneos.
- Quantificar a carga parasitária de cães naturalmente infectados por ***Leishmania*** spp. em amostra de pele, tecido conjuntival e sangue por PCR em tempo real;
- Quantificar a carga parasitária de flebotomíneos submetidos a xenodiagnóstico em cães naturalmente infectados por ***Leishmania*** spp.;
- Comparar a carga parasitária de amostras de pele, tecido conjuntival e sangue de cães naturalmente infectados por ***Leishmania*** spp. com a carga parasitária de flebotomíneos submetidos a xenodiagnóstico nestes cães.

REFERÊNCIAS

- ABDA, I. B.; MONBRISON, F.; BOUSSLIMI, N.; AOUN, K.; BOURATBINE, A.; PICOT, S. Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous ***Leishmania*** species in Tunisia. **Transctions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, p. 147-22, 2011.
- ADLER, S.; THEODOR, O. Skin infection in canine visceral leishmaniasis. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1179-1179, 1931.
- AGUIAR, G.M e MEDEIROS, W.M. Distribuição Regional e Habitat das Espécies de Flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, R.F. e LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 207-255, 2003.
- ALBUQUERQUE, P. L.; SILVA JUNIOR, G. B.; FREIRE, C. C.; OLIVEIRA, S. B.; ALMEIDA, D. M.; SILVA, H. F.; CAVALCANTE MDO, S.; SOUSA ADE, Q. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceara, Brazil. **Revista Panamericana Salude Publica**, v. 26, p. 330-333, 2009.
- ALENCAR, J.E.; Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.3, p. 175-180, 1961.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.
- ARANSAY, M.A.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of ***Leishmania*** DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p.1933-1938, 2000.

BADARÓ, R.; REED, S.G. **Leishmanioses in diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes** – 2a ed., p. 255-262, 2001.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; REED, S. G.; BARRAL, A.; et al. New Perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **Journal of infectious diseases**, v. 156, p. 1003-1011, 1986.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-330, Jul 2008.

BEZERRA-VASCONCELOS, D.R.; MELO, L.M.; ALBUQUERQUE, E.S.; LUCIANO, M.C.S.; BEVILAQUA, C.M.L. Real-time PCR to assess the Leishmania load in Lutzomyia longipalpis sand flies: Screening of target genes and assessment of quantitative methods. **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 234–239, 2011.

BLANCO, E. E. N.; PIMENTA, P.F.P.; SECUNDINO, N.F.C **Interação Vetor-Hospedeiro**. In: Rangel RF e Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. p. 275-289.

BRASIL, 2006. 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. Secretaria de Vigilância em Saúde. Glossário: Leishmaniose Visceral: **Informações Técnicas**. Brasília (DF), [2010].

Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31937>. Criado em 27/03/2014 e último acesso em 04/08/2014.

BRUMPT, E. Le Xenodiagnostic application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier a la ***Trypanosomose chagas***. **Annaes Paulista de Medicina e Cirurgia**, v. 98, 1914.

CAMARGO-NEVES V.L.F, RODAS L.A.C, POLETTO D.W, LAGE L, SPÍNOLA RM, CRUZ O, CARVALHO M.S. A Utilização da análise espacial na transmissão da leishmaniose visceral americana em Araçatuba. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34 (Suplemento), p.184, 2001.

CARDIM, M.F.M.; RODAS, A.C.L.; DIBO, M.R.; GUIRADO, M.M.; OLIVEIRA, A.M.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Introdução e expansão da leishmaniose visceral americana em humanos no estado de São Paulo 1999-2011. **Revista Saúde Pública**, v.47, n.4, p. 691-700, 2013.

CAVALCANTI, M. P. **Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães**. Tese de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz. Recife. Pernambuco. 2008.

CÓRDOBA-LANÚS, E.; DE GROSSO, M.L.; PIÑERO, J.E.; VALLADARES, B.; SALOMÓN, O. D. Natural infection of ***Lutzomyia neivai*** with ***Leishmania*** spp. in northwestern argentina. **Acta Tropica**, v. 98, p. 1-5, 2006.

COSTA, D.N.C.C; CODEÇO, C.; SILVA, M.A; WERNECK G.L. Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. **Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.8, p.2355- 2355, 2013.

COSTA I.P, CASANOVA C, RODAS L.A.C e GALATI E.A.B. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.31, p. 632-633, 1997.

COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; DE FIGUEIREDO GONTIJO, N.; MICHALICK, M. S.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. **Veterinary Journal** (London), v. 174, n. 3, p. 636-43, 2007.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314-20, 2002.

COTRIM CP. Métodos de Biologia Molecular e de DNA Recombinante. In: Ferreira AW e Àvila SLM. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto- imunes**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 49-59, 2001.

DEANE, M.P.; e DEANE, L.M. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente parasitada pela *Leishmania donovani*. **Hospital**, v. 46, p.651-653, 1954.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P.; Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem e do cão e da raposa (*Lycalopes vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. **Hospital**, v.48, p. 61-79, 1955a.

DEGRAVE W.; FERNANDES O.; CAMPBELL D.; BOZZA M.; Lopes U.; Use of Molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p.463-469,1994.

FELICIANGELI, M.D.; RODRIGUEZ N.; De GUGLIELMO Z.; RODRIGUEZ A. The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II. Vectors and parasites. **Parasite**, v.6, p.113-120,1999.

FORATTINI, O.P. **Entomologia Médica**. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. v. 4. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda; 1973.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; REGO, F.A.; OSHITO, E.T.; RODRIGUES M. Estudo de flebotomíneos (Díptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.31, p.378-390, 1997.

GRADONI, L.; MAROLI, M.; GRAMICCIA, M.; MANCIANTI, F. *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. **Medical and Veterinay Entomology**, v.1, p. 339-342, 1987.

GRIMALDI, Jr.G.; TESH RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6, p. 230-250, 1993.

HARRIS, E.; KROPP, G.; BELL, I A.; RODRIGUEZ, B.; AGABIAN, N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of new world *Leishmania* complexes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p. 1989-1995, 1998.

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R.; GELFAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease

activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the Natural Academy of Science of the United States of America**, v. 88, p. 7276-7280, 1991.

KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly and its role in the establishment of *Leishmania* infections. **Microbes and Infection**, v.2, p. 1765-1773, 2000.

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

KILLICK-KENDRICK, R. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sand fly. In: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. (Eds.), **Biology of the kinetoplastida**. Academic Press, London, New York & San Francisco, v. 2, p. 396-449, 1979.

KIMBLIN, K.; PETERS, N.; DEBRABANT, A.; SECUNDINO, N.; EGEN, J.; LAWYER, P.; et al. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. **Medical Science**, v.105, n.29, p. 10125–10130, 2008.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; LINS, Z.C. Leishmaniasis in Brasil, IV. The fox, *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, p. 741-745, 1969.

LAINSON R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W., Killick-Kendrich R. **The leishmaniasis in biology and medicine**, v.1, p.1-120, 1987.

LAINSON, R.; e SHAW, J.J. Epidemiological considerations of the leishmaniasis with particular reference to the New World. In: AM Fallis (Editor) **Ecology and Physiology of Parasites**, University of Toronto Press; 1971. p. 21-57.

LAURENTI, M.D.; ROSSI, C.N.; MATTA, V.L.R.; TOMOKANE, T.Y.; CORBETT, C.E.P.; SECUNDINO, N.F.C.; PIMENTA, P.F.P.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit ***Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*** to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v.196, n.3-4, p. 296-300, 2013.

LIRA, R. A.; CAVALCANTI, M. P; NAKAZAWA, M.; FERREIRA, A. G. P.; SILVA, E. D.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C.; SOUZA, W. V.; GOMES, Y. M. Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 11–16, 2006.

LUTZ A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.4, p.82-95, 1912.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L. M.; MORTE, R. D.; CRINGOLI, G.; Staiano, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 251-62, 2004.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; MANZILLO, V.F.; MICHELE, P.L.; Caracappa, S.; Gravino, A.E. **Leishmania** DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.142, p. 271–280, 2006.

MAIA-ELKHOURY, A.N.S; Alves, W.A; SOUSA-GOMES, M.L; SENA, J.M; LUNA, E.A. MANNA, L. et al. Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 271-280, 2006.

MAIA-ELKHOURY, A.N.S; Alves, W.A; SOUSA-GOMES, M.L; SENA, J.M; LUNA, E.A. MANNA, L. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MENDES, W. S.; TROVÃO, J. R.; SILVA, A. A. M. Dinâmica da ocupação do espaço na cidade de São Luís e a leishmaniose visceral. **Cadernos Saúde Pública**, v. 16, n. 3, p. 872, 2000.

MICHALSKY, E.M.E.; ROCHA, M.F.; LIMA, A.C.V.M.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; PIRES, M.Q.; OLIVEIRA, F.S.; et al. Infectivity of seropositive dogs, showing diferente clinical forms of leishmaniasis, to **Lutzomyia longipalpis** phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**, v.147, p.67-76, 2007.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRES, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 4, p. 491-3, Jul-Aug 1994.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399-405, Sep 2002.

MOHAMMADIHA, A.; MOHEBALI, M.; HAGHIGHI, A.; MAHDIAN, R.; ABADI, A.R.; ZAREI, Z.; et al. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 89-94, 2013.

MYSKOVA, J.; VOTYPKA, J. and VOLF, P. *Leishmania* in Sandflies: Comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. **Journal of Medical Entomology**, v.45 n. 1, p. 133-138, 2008.

NUNES, C.M.; LIMA, V.M.; PAULA, H.B.; PERRI, S.H.; ANDRADE, A.M.; DIAS, F.E.; BURATTINI, M.N. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.153, p. 19-23, 2008.

PARROT, L., DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F. Sur le developpement du parasite de la leishmaniose canine viscerale chez *Phlebotomus major* var. *pemiciosus* Newstead. **Bulletin de la Sock de Pathologie Exotique**, V. 23, p. 724-726, 1930.

PARVIZI, P.; MAURICIO, I.; ARANSAY, M. A.; MILES, M. A.; READY, P. D. First detection of *Leishmania major* in peridomestic *Phlebotomus papatasi* from Isfahan province, Iran: comparison of nested PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, v. 93, p. 75-83, 2005.

PEREIRA-CHIOCCOLA, VERA L.. Diagnóstico molecular das leishmanioses: contribuição ao Programa de Vigilância e Controle da LVA no Estado de São Paulo. BEPA. **Boletim Epidemiológico Paulista** (Online), v. 6, p. 4-13, 2009.

PIMENTA, P.F.P.; TURCO, S.T.; M.C, CONVILLE, M.J.; LAWYER, P.G.; PERKINS, P.V.; SACKS, D.J. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, v. 256, p. 1812-1815, 1992.

PIMENTA, P.F.P.; MODI, G.B.; PEREIRA, S.T.; SHAHABUDDIN, M; SACKS, D.L.; A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. **Parasitology**, v.115, p.359-369, 1997.

QUARESMA, P. F.; MURTA, S. M.; FERREIRA EDE, C.; DA ROCHA-LIMA, A. C.; XAVIER, A. A.; GONTIJO, C. M. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, v. 111, n. 3, p. 289-94, Sep 2009.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915-34, Dec 2009.

RANASINGHE, S.; ROGERS, E.M.; HAMILTON, C.G.J.; BATES, A.P.; MAINGON, C.D.R. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, p. 875-882. 2008.

RANGEL O, HIRAMOTO R.M, HENRIQUES L.F, TANIGUCHI H.H, CIARAVOLO R.M.C, TOLEZANO J.E, et al. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral

Americana no Estado de São Paulo, para 2013. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.10, p. 3-14, 2013.

RIBEIRO, J.M.C.; ROSSIGNOLL, S.P.A. Blood finding strategy of a capillary-feeding *Lutzomyia longipalpis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 83A, p. 63- 686, 1986.

RIOUX, J. A., LANOTTE, G., CROSET, H. & DEDET, J. P. Ecologic des leishmanioses dans le sud de la France. 5. Pouvoir infestant compare des diverses formes de leishmaniose canine vis-a-vis de Phlebotomus ariasi Tonnoir, 192 1. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparie**, V.47, p. 413-419, 1972.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v.71, p.267-275, 1990.

RODRIGUES, A. C. E. **Características epidemiológicas e distribuição espacial da enzootia canina de Leishmaniose Visceral na cidade de Teresina – Piauí, no período de 2003-2006**. Teresina, PI, 2008. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, 2008.

SACKS, D.L.; HIENY, S.; SHER, A. Identificcation of an infective stage of *Leishmania major* promastigotes. **Journal of Immunology**, v.139, p. 564-570, 1984.

SACKS, D.L.; et al. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundance surface lipophosphoglycan. **Journal of Experimental Medicine**, v.181, p. 685-697, 1995.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; HOFFMAN, M.P.; FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A.F.; Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v.12, p.315-317, 1998.

SANTOS, S. O. et al. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is ***Lutzomyia cruzi***. Corumbá, Mato grosso do Sul State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 633-634, 2003.

SÃO PAULO - Secretaria da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do estado de São Paulo**. São Paulo, 2006. 158 p.

SÃO PAULO - Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjak. LVAH – **Casos autóctones e óbitos por LPI**. São Paulo; Fonte: SINANNET/Divisão de Zoonoses CVE/CCD/SES-SP e dados provisórios atualizados em 02/05/2013*. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_leishvis.html acesso em 06/08/2014.

SCHMIDT, M.I.; DUNCAN, B.B.; in Rouquayrol MZ, Almeida DIlho N. **Epidemiologia & Saude**, 6ª edição. Editora Medsi, 2003.

SECUNDINO, N.F.C.; FREITAS, V.C.; MONTEIRO, C.C.; PIRES, A.C.A.; DAVID, B.A.; PIMENTA, P.F.P. The transmission of ***Leishmania infantum chagasi*** by the bite of the ***Lutzomyia longipalpis*** to two different vertebrates. **Parasites & Vectors**, v.5, p. 20, 2012.

SHAW, J.J. Further thoughts on the use of the name ***Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*** for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n.5, p. 577-579, 2006.

SHERLOCK, J.A.; MIRANDA, J.C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI, Jr.G. Natural infection of the opossum ***Didelphis albiventris*** (Marsupialia, Didelphidae) with ***Leishmania donovani***, in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 511, 1984.

SILVEIRA, F.T. et al. Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox, ***Cerdocyon thous*** (L) as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 76: 830-832, 1982.

SOARES, R.P.P.; TURCO, S. ***Lutzomyia longipalpis*** (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 3, p. 301-330, 2003.

SOARES, M.R.; MENDONÇA, I.L.; BONFIM, J.M.; RODRIGUES, J.A.; WERNECK, G.L.; COSTA, C.H. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Tropica**, v.117, n.1, p. 6-9, 2011.

SOLANO-GALLEGO L.; MIRO, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v.4, p.86-102, 2011.

TRAVI, B.L. et al. ***Lutzomyia evansi***, an alternative vector of ***Leishmania chagasi*** in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.84, p. 676-677, 1990.

TRAVI, B.L. et al. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, p. 557- 565, 1994.

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 3-4, p. 119-24, Mar-Apr 2001.

ULIANA, S. R. B.; AFFONSO, M. H. T.; CAMARGO, E. P.; FLOETER-WINTER, L.M. Leishmania: Genus Identification Based on a Specific Sequence of the 18S ribosomal RNA Sequence. **Experimental Parasitology**, v.72, p.157-163, 1991.

WERNECK GL, PEREIRA TJCF, FARIAS GC, SILVA FO, CHAVES FC, GOUVÊA MV, et al. (2008) Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial – 2004. **Epidemiologia Serviços de Saúde**, v. 17, n.2, p.87-96, 2008.

WHO. **Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. World Health Organization. Geneva, 22–26 March 2010.

VOLF, P.; HAJMOVA, M.; SADLOVA, J.; VOTYPKA, J. Blocked stomadeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. **International Parasitology**, v.34, p. 1221-1227, 2004.

CAPÍTULO 2 – DETECÇÃO DE *Leishmania* spp. EM FLEBOTOMÍNEOS SUBMETIDOS A XENODIAGNÓSTICO

RESUMO - Um dos fatores essenciais para a transmissão da leishmaniose visceral (LV) é a presença do vetor cuja taxa infecção é um importante parâmetro a ser considerado para a vigilância desta zoonose. O presente estudo objetivou comparar métodos de detecção de *Leishmania* spp. em flebotomíneos submetidos a xenodiagnóstico realizado em cães acometidos por leishmaniose visceral, com o intuito de contribuir com estudos sobre a infectividade de cães ao vetor. Flebotomíneos foram capturados em área urbana, metade das fêmeas foram mantidas como controle para avaliação de infectividade natural e a outra metade foi exposto ao cão acometidos por leishmaniose visceral, por 12 horas. Após cinco dias, as fêmeas foram dissecadas e submetidas à avaliação parasitológica (demonstração direta do parasito- DDP e contagem em câmara de Neubauer-NC) e molecular (PCR convencional e em tempo real - qPCR). A taxa de infecção natural foi zero pela DDP, 1,4% por PCR e 2,36% por qPCR. A positividade dos flebotomíneos pós-xenodiagnóstico foi de 18,6%, por DDP, de 19,9 por NC, de 25,9% por PCR e de 84% por qPCR. A concordância entre a DDP e NC foi considerada excelente ($K=0,8653$), entre a DDP e a PCR foi boa ($K=0,6316$), bem como entre a PCR e qPCR ($K=0,79$). Já a concordância entre a DDP e a qPCR foi considerada moderada ($K=0,4011$) e entre qPCR e NC foi considerada leve ($K=0,14$). Considerando-se a qPCR como teste padrão, a sensibilidade da DDP foi de 53% e a especificidade de 90%, da PCR a sensibilidade foi de 94% e a especificidade de 84%. A sensibilidade da NC foi de 44% e a especificidade de 82%. Tanto a PCR convencional quanto a PCR em tempo real (qPCR) revelaram-se mais adequadas para a avaliação da infectividade canina.

Palavras-Chave: Leishmaniose visceral, *Lutzomyia longipalpis*, PCR, qPCR.

DETECTION OF *Leishmania* spp. IN SANDFLIES INFECTED DURING XENODIAGNOSIS

SUMMARY - A key to the transmission of visceral leishmaniasis (VL) is the presence of the vector whose infection rate is an important parameter to be considered for the surveillance of this zoonotic disease. The present study aimed to compare *Leishmania* spp. detection methods in sandflies that underwent xenodiagnosis performed in dogs with visceral leishmaniasis, aiming at contributing to studies on the infectivity of dogs to the vector. Sandflies were captured in urban areas, half of the females were kept as controls for the natural infectivity evaluation and the other half was exposed to the dog affected by visceral leishmaniasis, for 12 hours. After five days, the females were dissected and subjected to parasitological evaluation (direct demonstration of the parasite-DDP and counting in a Neubauer chamber-NC) and molecular evaluation (conventional PCR and real-time PCR (qPCR)). Sandflies natural infection rate was zero by DDP, 1.4% by PCR and 2.36% by qPCR. Sandflies positivity post-xenodiagnosis was 18.6% by DDP, 19.9 by NC, 25.9% by PCR and 84% by qPCR. Agreement between DDP and NC was considered excellent ($K=0.8653$), between DDP and PCR was good ($K = 0.6316$), as well as between PCR and qPCR ($K=0.79$). Correlation between DDP and the qPCR was considered moderate ($K = 0.4011$) and between qPCR and NC was considered slight ($K=0.140$). Considering qPCR as the standard method, DDP showed sensitivity of 53% and specificity of 90%; PCR showed sensitivity of 94% and specificity of 84%. The sensitivity of the NC was 44% and the specificity was 82%. Both conventional PCR and real-time PCR (qPCR) were appropriate for evaluating canine infectivity to sandflies.

Keywords: Visceral Leishmaniasis, *Lutzomyia longipalpis*, PCR, qPCR.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é um importante problema de saúde pública no Brasil, tanto por sua gravidade quanto pela velocidade de expansão que se tem observado, principalmente nas últimas décadas (SÃO PAULO, 2006).

Um dos fatores essenciais para a transmissão da LV é a presença do vetor, sendo importante a identificação correta da espécie de flebotômíneo e das espécies de *Leishmania* transmitidas por esses dípteros (BRAZIL; BRAZIL, 2003; KATO et al., 2005; MICHALSKY et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 1999). Além disto, a taxa de flebotômíneos naturalmente infectados é um parâmetro importante a ser considerado para a vigilância desta zoonose, bem como para estudos epidemiológicos.

O cão assume grande importância na dispersão e transmissão desta zoonose, por sua proximidade com o homem, sendo considerado o reservatório doméstico mais importante na área urbana (LAINSON; SHAW 1987, MARZOCHI et al., 1994; VIEIRA; COELHO, 1998). A infectividade do reservatório canino é avaliada por meio de xenodiagnóstico. Assim, a avaliação da taxa de infecção de flebotômíneos requer testes que tenham alta sensibilidade e especificidade.

Alguns testes diagnósticos têm sido utilizados para avaliação da infecção em flebotômíneos, como por exemplo, o parasitológico por visualização direta do parasito (DDP) ou por contagem em câmara de Neubauer (NC) e, mais recentemente, a amplificação de DNA por PCR e a quantificação do protozoário por PCR em tempo real (qPCR) (MYSKOVA et al., 2008). Os métodos parasitológicos são mais trabalhosos e têm baixa sensibilidade, PCR e qPCR tem maior sensibilidade e especificidade, podem ser feitos mais rapidamente mas são mais caros e requerem mais equipamentos (MYSKOVA et al., 2008).

Objetivou-se, portanto, comparar os métodos parasitológicos, de visualização direta (DDP) e contagem em câmara de Neubauer (NC), e os

métodos moleculares de PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR) utilizados para detectar a presença de *Leishmania* spp. em flebotomíneos submetidos a xenodiagnóstico com o objetivo de contribuir com os estudos de avaliação da infectividade de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

MATERIAL E MÉTODO

Capturas entomológicas

Exemplares adultos de flebotomíneos foram capturados em área urbana do município de Araçatuba, SP, Brasil, em imóveis previamente selecionados por apresentarem ambiente propício para a criação e manutenção do vetor e presença de animais como fonte de alimento. As coletas foram realizadas com aspirador manual e os exemplares vivos foram dispostos em gaiolas de voil 20x20cm em estufa (D.B.O – Eletro lab - 101 M), sob umidade de 86% e temperatura de 25,5°C, alimentados com solução de mel de abelha (1:1 em água destilada) e permaneceram em repouso por 12 horas. Após este período, os exemplares de *Lu. longipalpis* que foram utilizados no xenodiagnóstico permaneceram em jejum por 12 horas; os do grupo controle permaneceram nas condições já mencionadas, sendo posteriormente dissecados e acondicionados em álcool isopropílico 90% ou em *RNA later* (AMBION®), a 4°C, para avaliação da infecção natural por *Leishmania* spp. por meio da amplificação de DNA por PCR em tempo real (qPCR).

Infecção de flebotomíneos por meio de xenodiagnóstico canino

Um total de 32 experimentos de xenodiagnósticos foi realizado durante o período de novembro de 2012 a maio de 2014, em local devidamente telado.

Os cães submetidos ao xenodiagnóstico foram aqueles indicados para eutanásia, conforme legislação vigente e protocolo estabelecido pelo Programa de Controle de Populações de Cães e Gatos do Estado de São Paulo (2006), por apresentarem presença de anticorpos anti-***Leishmania*** e/ou avaliação parasitológica positiva de biopsia aspirativa de linfonodo poplíteo.

Em cada experimento foi utilizado um cão, o qual foi mantido por 12 horas, a partir do crepúsculo, em gaiolas de metal revestidas por capa de tecido **voil**, confeccionada com manguito para adequada manipulação dos flebotomíneos. O número de fêmeas de ***Lu. longipalpis*** sem sangue no abdômen ou que apresentavam apenas um terço do abdômen preenchido, bem como similar número de machos, que foram soltos na gaiola para a realização do repasto no cão variou de cinco a 49 e foram recapturados depois de 12 horas de exposição, com o auxílio de capturadores manuais. As condições de temperatura e umidade relativa do ar foram verificadas durante o período de exposição das fêmeas e correlacionadas com a taxa de mortalidade das mesmas.

Após o período de exposição, os flebotomíneos foram mantidos em estufa nas condições controladas anteriormente citadas, por cinco dias, sendo alimentados com solução de mel de abelha (1:1 em água destilada), quando então foram expostos ao frio (-20 °C) para dissecação.

Um total de 2.902 exemplares de ***Lu. longipalpis*** foram utilizados para a realização dos experimentos de xenodiagnóstico, sendo no total 828 fêmeas para os testes e 623 para os controles.

Para a comparação dos métodos DDP e PCR foram utilizadas 981 fêmeas de ***Lu. longipalpis*** de 27 experimentos de xenodiagnósticos; para a comparação

do DDP e qPCR utilizou-se 206 exemplares de 15 experimentos e para a comparação de DDP e NC 285 amostras de 12 experimentos.

Avaliação laboratorial dos flebotomíneos

Avaliação parasitológica (demonstração direta do parasito e contagem em câmara de Neubauer)

As fêmeas foram dissecadas sob estereomicroscópio, com o auxílio de estiletes, sobre lâmina contendo 50 µL de solução fisiológica 0,9%. A confirmação da espécie do flebotomíneo baseou-se no aspecto morfológico da espermateca, ao microscópio óptico (aumento de 400 vezes), segundo a chave taxonômica proposta por GALATI (2003).

Realizou-se a extração de todo o tubo digestório para pesquisa de formas evolutivas de *Leishmania* spp. Considerou-se positiva a fêmea que apresentasse ao menos uma forma flagelada do parasito.

Para quantificar o número de parasitos por flebotomíneo, o intestino médio de cada flebotomíneo foi transferido para tubos plásticos contendo PBS 0,01M, pH 7,0, sendo macerados com o auxílio de pistilo plástico. A contagem foi realizada no volume de 10 µL, em câmara de Neubauer.

Para o cálculo do número de parasitos total (**N**), foi aplicada a fórmula:

$$N = \frac{x.500}{\text{númerodecampos visualizados}} ,$$

onde **x** = número de parasitos visualizados na câmara de Neubauer.

O material proveniente da dissecação foi acondicionado em tubos plásticos em *RNA later*®, a 4°C, para posterior extração e amplificação de DNA, por PCR convencional e por PCR em tempo real (qPCR).

Extração e amplificação de kDNA de *Leishmania* spp. de flebotomíneos

Seguiu-se o protocolo de KATO et al., (2007), com modificações. O material proveniente da avaliação parasitológica dos flebotomíneos foi centrifugado por 2 minutos, a 15.871g, e macerado com pistilo e pérolas de vidro (2 mm). Após descarte do sobrenadante, adicionaram-se 75 µL de solução de tampão de lise (150 mM de NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 0,1% SDS e 200 µg/mL de proteinase K - Ambion®-D10860413), seguindo-se a incubação por 6 horas, a 65°C. As amostras foram então centrifugados por 2 min. a 15.871g e posteriormente adicionados 35 µL de água estéril, misturando-se cuidadosamente, seguindo-se nova centrifugação e transferência do sobrenadante contendo o DNA.

A amplificação de DNA de cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp. em flebotomíneos foi realizada por PCR convencional utilizando-se o kit EmeraldAmp GT master mix (Clontech®, Takara RR320B), 1 µL do DNA diluído 1:10 e 10 pmol/µL de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores que amplificam um fragmento de kDNA de *Leishmania* spp. de 120 pb descritos por FRANCINO et al., (2006) e modificados por Calvo-Bado (não publicado): **forward** 5'-AACTTTTCT GGTCTCCGGGTAG-3' e **reverse**: 5'-ACCCCAGTTTTCCGCC-3', em volume final de 12,5 µL, de acordo com as recomendações do fabricante. As condições da PCR foram 35 ciclos a 98°C por 10s, 60°C por 30s e 72°C por 30s. O resultado final foi visualizado em gel de agarose a 2%, sob luz ultravioleta.

A amplificação de kDNA de *Leishmania* spp. também foi realizada por qPCR, utilizando-se 900 nM dos oligonucleotídeos iniciadores já descritos, 250nM da sonda 6FAM 5' -AAAAATGGGTGCAGAAACCCCGTTTC-3'—BBQ, num volume final de 15 µL, contendo 2X TaqMan master mix (Applied Biosystems®). As condições da reação foram 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1

min, em termociclador 7500 Fast-Real Time PCR system (Applied Biosystems). A quantificação absoluta de *Leishmania* spp. foi feita com base na comparação dos valores dos limiares de fase exponencial (Ct - do inglês **cycle threshold**) com os obtidos na curva padrão, construída a partir de 10 séries de diluições (0,01 a 10^5 parasitos/mL) de DNA extraído de cultura de promastigotas de *Leishmania infantum* (ITAMP-263 DD8). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. Considerou-se positiva a amostra que apresentasse resultado de carga maior que zero em Ct menor ou igual a 36.

Análise estatística

A concordância entre as técnicas diagnósticas foi avaliada por meio do coeficiente de concordância Kappa e interpretado de acordo com a classificação de Landis e Koch (1977).

Uma vez que a distribuição dos valores de carga parasitária apresentou-se assimétrica, os valores de carga parasitária resultantes da qPCR e de contagem direta de parasitos foram transformados para logaritmos de base 10, a fim de se obter uma distribuição log normal dos dados. Uma vez que o logaritmo de zero (ausência do parasito) não é definido matematicamente, considerou-se para ausência de parasito o valor igual a -2, pois é um valor abaixo do limite de detecção. Adotou-se nível de confiança de 95% em todas as análises estatísticas.

Esta pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UNESP, câmpus de Araçatuba (processo FOA 01984-2012).

RESULTADOS

Um total de 2.902 espécimes de *Lu. longipalpis* foram utilizados para os xenodiagnósticos sendo 1451 machos, 828 fêmeas testes e 623 fêmeas controle. Entretanto, nem todos os exemplares de flebotomíneos puderam ser avaliados por todos os testes: 982 exemplares de 27 xenodiagnósticos foram avaliados pela DDP e pela PCR, 285 de 12 xenodiagnósticos foram avaliados pela DDP e NC, e somente 206 exemplares de 12 xenodiagnósticos foram avaliados pela qPCR.

Limiar de detecção e ponto de corte da qPCR

Considerando-se os valores de Ct de todas as reações de qPCR realizadas dos padrões, calculou-se o limiar de detecção de maneira similar àquele utilizado para eletrodos íon-seletivos, que apresentam o mesmo padrão de resposta (método IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada) resultando em valor de 0,04 parasitos/flebotomíneo (cujo logaritmo é igual a - 1,40) (BUCK e LINDNER, 1994).

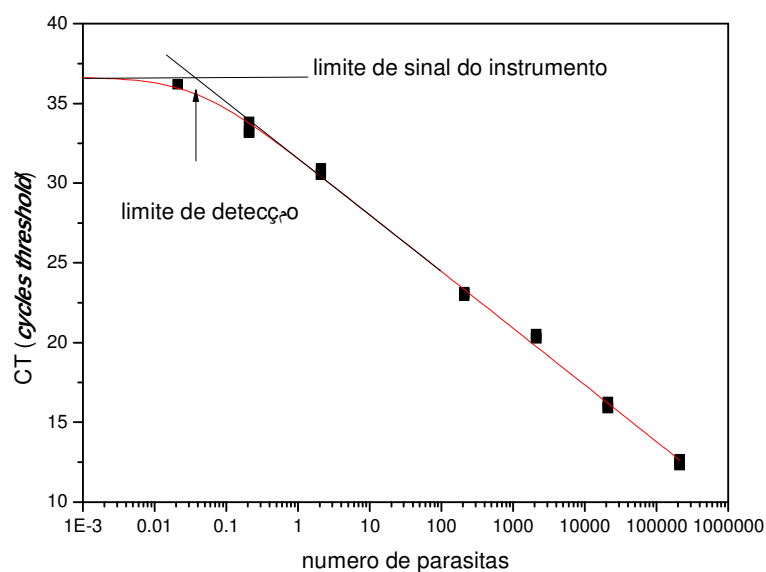


Figura 1- Curva de calibração da técnica de PCR em tempo real para amplificação do kDNA de *Leishmania* spp. e limiar de detecção estimado.

Os resultados de cada um dos métodos quantitativos (qPCR e contagem em câmara de Neubauer - NC) foram separados em dois grupos: um formado por fêmeas que tiveram os resultados da demonstração direta do parasito (DDP) positivos e outro grupo formado por fêmeas que tiveram os resultados da DDP negativos. As curvas de distribuição de frequências acumuladas para a qPCR e para a câmara de Neubauer são apresentadas na Figura 2. Um dos problemas relativos à validação da qPCR é o estabelecimento do ponto de corte (**cut-off**). Considerando-se o limiar de detecção da qPCR (0,04 parasitos), adotou-se o valor de 0,1 parasitos por flebotomíneo (logaritmo igual a -1) para o ponto de corte.

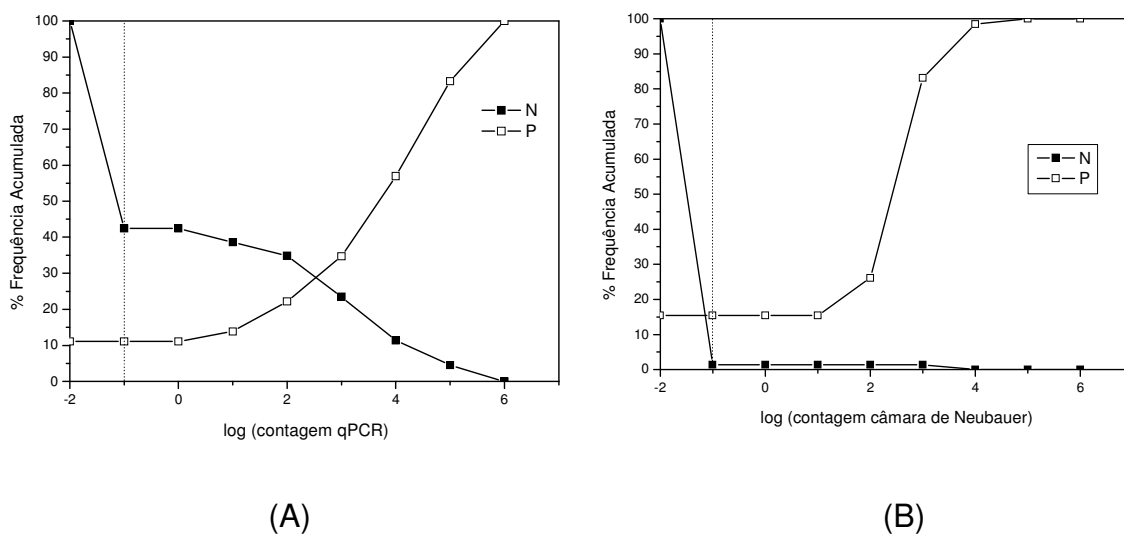


Figura 2- Distribuição de frequência acumulada dos logaritmos de número de parasitos observados pela qPCR (A) e pela contagem em câmara de Neubauer (B), considerando-se os resultados positivos e negativos observados pela demonstração direta do parasito (DDP).

Infecção natural e pós-xenodiagnóstico de *Lutzomyia longipalpis*

A taxa de infecção natural foi de 1,4% considerando-se a avaliação por PCR, 2,36% por qPCR e zero pela demonstração direta do parasito, não houve avaliação da infectividade natural através da câmara de Neubauer (Tabela 1).

A positividade geral, pós-xenodiagnóstico, foi de 18,6% (140/752) considerando-se a demonstração direta do parasito (DDP), de 19,9% (58/292) para a contagem em câmara de Neubauer, de 25,9% (165/638) por PCR e de 84,0% (116/138) por qPCR.

Tabela 1 - Percentual de positividade para *Leishmania* spp. de *Lutzomyia longipalpis* submetidas a xenodiagnóstico em cães acometidos por leishmaniose visceral e capturadas no campo (controle) aos testes diagnósticos de demonstração direta do parasito (DDP), PCR e qPCR.

Classificação das fêmeas	Metodologia Laboratorial	Infecção (%) (Positivas / total examinadas)		Intervalo de Confiança (%)
				(95% confiança)
Pós xenodiagnóstico	DDP	19,3	(140/752)	15,8 a 21,4%
	NC	19,9	(58/292)	15,3 a 24,4%
	PCR	25,1	(165/638)	22,5 a 29,3%
	qPCR	84,1	(116/138)	78,0 a 90,2%
Controle (Campo)	DDP	0,0	(0/623)	-
	PCR	1,4	(6/424)	0,3 a 2,5%
	qPCR	11,4	(10/88)	0,0 a 18,%

Validação dos métodos diagnósticos

A concordância entre a DDP e NC foi considerada excelente ($K=0,8653$); entre a DDP e a PCR foi considerada boa ($K=0,6316$), bem como entre a PCR e qPCR ($K=0,79$).

Já a concordância entre a DDP e a qPCR foi considerada moderada ($K=0,4011$) e entre qPCR e NC foi considerada leve ($K=0,14$). Considerando-se a qPCR como teste de referência, a sensibilidade da DDP foi de 53% e a especificidade de 90%, da PCR a sensibilidade foi de 94% e a especificidade de 84%. A sensibilidade da NC foi de 44% e a especificidade de 82% (Tabela 02).

Tabela 2- Resultado dos testes de detecção de *Leishmania* spp. em flebotomíneos submetidos ou não a xenodiagnóstico em cães naturalmente infectados, considerando-se a qPCR como teste de referência

Testes		qPCR		
		Positivo	Negativo	Total
PCR	Positivo	106	11	117
	Negativo	7	57	64
	Total	113	68	181
DDP	Positivo	65	8	73
	Negativo	57	76	133
	Total	122	84	206
NC	Positivo	21	2	23
	Negativo	27	9	36
	Total	48	11	59

DISCUSSÃO

A avaliação dos métodos diagnósticos utilizados para identificar a infecção de flebotomíneos por *Leishmania* spp. foi realizada com flebotomíneos submetidos a xenodiagnóstico com o objetivo de contribuir com os estudos de avaliação da infectividade de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

A taxa de infecção natural foi baixa, independentemente do método diagnóstico utilizado, variando conforme o método diagnóstico (de zero a 11,4%). Tais resultados são concordantes com os observados por Córdoba-Lanús et al.

(2006) que, embora tivessem avaliado área endêmica para leishmaniose cutânea no noroeste da Argentina, observaram 0,9% das fêmeas de *Lutzomyia neivai* positivas à PCR convencional, e também não observaram o protozoário à avaliação microscópica. Carvalho et al. (2008) avaliaram flebotomíneos de pesquisa realizada em Belo Horizonte, MG e não observaram nenhuma forma flagelada à DDP enquanto que utilizando a PCR convencional puderam detectar 0,83% de *Lu. whitmani* naturalmente infectada com *Le. (Viannia)* spp. e 7,14% de *Lu. cortelezzii* infectadas por *L. chagasi*. Felipe et al. (2011) observaram taxa de infecção natural baixa no município de Raposa, MA com 1,6% de positividade entre as 448 *Lu. longipalpis* analisadas por meio da PCR, confirmando que a positividade natural dos flebotomíneos, em geral, é baixa. Assim como na presente pesquisa, outros autores também observaram taxa de infecção maior quando utilizaram a PCR comparando à dissecação (RYAN et al., 1990; MIRANDA et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 1999).

As taxas de infecção observadas à qPCR, tanto do grupo controle (infecção natural) quanto para o grupo teste foram superiores às da visualização direta do protozoário (DDP), possivelmente pelo limiar de detecção da qPCR ser mais baixo que o da DDP, além da dificuldade de se observar algum parasito à microscopia ótica quando a carga parasitária é muito baixa. Nicolas et al. (2002) também utilizaram a amplificação de fragmento de 120 pares de bases de kDNA, porém trabalharam em amostras de tecidos de camundongo e observaram detecção a partir de 0,1 parasito à qPCR, segundo eles essa técnica mostrou-se tão sensível quanto a PCR convencional, porém mais rápida.

Por outro lado, Ranasinghe et al. (2008) observaram sensibilidade diagnóstica de aproximadamente 120 parasitos, enquanto que na presente pesquisa, esta foi de 0,04 parasitos. Já Bezerra-Vasconcelos et al. (2011) mostraram um limiar de detecção dez vezes menor (0,004 parasitos/flebotomíneo) que o da presente pesquisa trabalhando com os oligonucleotídeos iniciadores do DNA do cinetoplasto (kDNA).

Algumas questões metodológicas como a transferência do flebotomíneo da lâmina para o microtubo e a homogeneização adequada também podem contribuir para o baixo limiar de detecção desses testes (MYSKOVA et al., 2008). Nossa experiência pessoal confirma tal observação uma vez que de 10 falsos negativos observados à contagem em câmara de Neubauer, oito coincidiram com o início do uso desta metodologia.

Com relação às técnicas parasitológicas é importante ressaltar que a demonstração direta do parasito (método qualitativo) é importante para avaliação de metaciclogênese (SACKS et al. 1984, 1987; PIMENTA et al., 1991; PIMENTA et al., 1989) bem como para a localização das formas do protozoário no inseto vetor (VOLF et al., 2004) sendo, portanto, imprescindíveis para os estudos da interação parasito e vetor.

No Brasil, a borrifação para o controle do inseto é preconizada pelo Programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral em um raio de 200 metros em torno de cada caso humano, independente da infectividade do vetor (SÃO PAULO 2006). Esta é uma atividade de alto custo operacional e que, por este motivo, muitas vezes não realizada. Considerando-se que Miranda et al. (2002), apontaram a heterogeneidade na distribuição espacial de flebotomíneos infectados, com a formação de agregados, a rápida detecção destes agregados pelas técnicas moleculares, deverá resultar em redução da área de aplicação de inseticida bem como contribuir para a diminuição do risco de indução de resistência desses insetos.

CONCLUSÃO

As técnicas moleculares de PCR e qPCR revelaram boas características diagnósticas demonstrando ser uma ferramenta adequada para a avaliação da infectividade canina, apresentando ainda a vantagem do processamento de um

grande número de flebotomíneos em pouco tempo, podendo ser bastante útil para as atividades de vigilância entomológica da leishmaniose visceral.

Assim, considerando-se o uso da PCR convencional (qualitativo) ou da qPCR (quantitativo), a grande vantagem da automação do processo de detecção de infecção de um grande número de flebotomíneos em pouco tempo, avaliamos que seriam técnicas vantajosas a serem introduzidas nos laboratórios de entomologia médica como ferramenta de vigilância entomológica.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa recebida (processo Nº 2062/13-5), aos funcionários de Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Araçatuba, aos Laboratório de Ecologia e Epidemiologia da **School of Life Science** da Universidade de Warwick, Inglaterra, à equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da FMVA, UNESP de Araçatuba e à Superintendência de Controle de Endemias do estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS

BRAZIL e GOMES BRAZIL. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: Rangel RF e Lainson R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz;. p. 257-274, 2003.

BUCK. R.P.; LINDNERI, E. Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes. **Pure and Applied Chemistry**, v.66, n.12, p. 2527-2536, 1994.

CARVALHO, G.M.L.; ANDRADE, F.J.D.; FALCÃO, A.L.; LIMA, A.C.V.M.R.; GONTIJO, C.M.F. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 3, p. 407-414, 2008.

CÓRDOBA-LANÚS E, De GROSSO, L.M.; PIÑERO, R.J.; VALLADARES, B.; SALOMÓN, D.O. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. **Acta Tropica**, v. 98, p. 1-5, 2006.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of Molecular Probes and PCR for Detection and typing of *Leishmania* – a Mini-Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n.3, p.463-469, 1994.

FELIPE, A.M.I.; AQUINO, C.M.D.; KUPPINGER, O.; SANTOS, C.D.M.; RANGEL, S.E.M.; BARBOSA, S.D. et al. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic área in Maranhão, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n.2, p. 207, 2011.

FORATTINI, O.P. Entomologia Médica. Psychodidae. **Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose**. v. 4. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda; 1973.

GALATTI, E.A.B. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In: Rangel E.F.; Lainson R., organizadores. **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p.53-175, 2003.

KATO H.; UEZATO, H.; KATAKURA, K.; CALVOPÍÑA, M. MARCO, D.J.; BARROSO, A.P.; et al. Detection and Identification of ***Leishmania*** Species within Naturally Infected Sand Flies in the Andean Areas of Ecuador by a Polymerase Chain Reaction. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 1, p. 87-93, 2005.

KATO, H.; UEZATO, H.; GOMEZ, E.A.; TERAYAMA, Y.; CALVOPÍÑA, M.; IWATA, H.; HAHIGUCHI, I. Y. Establishment of a Mass Screening Method of Sand Fly Vectors for ***Leishmania*** Infection by Molecular Biological Methods. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, 77 (2): 324-329, 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution: In: Peter, W e Killick-Kendrick R (Eds.). **The leishmaniasis in biology and medicine**, v.1, London, Academic Press; 1987.

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

MIRANDA, J.C.; REIS, E.; SCHRIEFER, A.; GONÇALVES, M.; REIS, M.G.; CARVALHO, L.; FERNADES, O.; et al. Frequency of infection of ***Lutzomyia*** Phlebotomines with ***Leishmania braziliensis*** in a Brazilian endemic area as assessed by Pinpoint Capture and Polymerase Chain Reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. V. 97, n.2, p. 185-188, 2002.

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

MICHALSKY, E.; FORTE-DIAS, C.L.; PIMENTA, P.F.P.; SECUNDINO, F.C.N.; DIAS, E.S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 255-259, 2002.

MYSKOVA, J.; VOTYPKA, J. VOLF, P. *Leishmania* in Sandflies: Comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. **Journal of Medical Entomology**, v. 45. n. 1, p.133-138, 2008.

NICOLAS, L.; PRINA, E.; LANG, T.; MILON, G. Real-Time PCR Detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1666-1669, 2002.

PIMENTA, P.F.; DA SILVA, R.P.; SACKS, D.L.; DA SILVA, P. Cell surface nanoanatomy of *Leishmania major* as revealed by fracture-flip: a surface meshwork of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stage promastigotes. **European Journal of Cell biology**, v.48, p.180-190,1989.

PIMENTA, P.F.; SARAIVA, B.E.M.; SACKS, D.L. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three-life stage of *Leishmania major*. **Experimental Parasitology**, v.72, p. 191-197. 1991.

RANASINGHE, S.; ROGERS, E.M.; HAMILTON, C.G.J.; BATES, A.P.; MAINGON, C.D.R. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sad fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, p.875-882, 2008.

RYAN, L.; VEXENAT, A.; MARSDEN, P.D.; LAINSON, R.; SHAW, J.J. The importance of rapid diagnosis of new cases of cutaneous leishmaniasis in pinpointing the sandfly vector. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.84., p.786, 1990.

RODRIGUEZ, N.; AGUILAR, C.M.; BARRIOS, M.A.; BARKER, D.C. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sand flies by the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p.47-49, 1999.

SACKS, D.L.; HIENY, S.; SHER, A. Identification of an infective stage of *Leishmania major* promastigotes. **Journal of Immunology**, v.139, p. 564-570, 1984.

SACKS, D.L.; Da SILVA, R. The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. **Journal of Immunology**, v.139, p. 3099-3106, 1987.

VIEIRA, J.B.F.; COELHO, G.E. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n.2, p. 85-92, 1998.

VOLF, P.; HAJMOVA, M.; SADLOVA, J. VOTYPKA, J. Blocked stomadeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. **International Journal of Parasitology**, v.34, p.1221-1227, 2004.

CAPÍTULO 3 - RELAÇÃO ENTRE CARGA PARASITÁRIA E SINAIS CLÍNICOS DE CÃES NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO - Avaliar, por xenodiagnóstico, a infectividade de cães com diferentes sinais clínicos da doença, quantificando a carga parasitária de amostras de pele, **swab** conjuntival e de sangue do cão e dos vetores foi o objetivo deste trabalho. Para tanto, realizaram-se 38 xenodiagnósticos com flebotomíneos capturados em área urbana de Araçatuba, SP em cães sorologicamente positivos. Após cinco dias do repasto no cão, as fêmeas foram dissecadas, submetidas à avaliação parasitológica através da demonstração direta do parasito (DDP) e contagem em câmara de Neubauer (NC), o DNA foi extraído e a PCR convencional e quantificação da carga parasitária, por qPCR, foi realizada. Dos cães foi feita a avaliação dos sinais clínicos e amostras de sangue, **swab** conjuntival e de pele de orelha foram colhidas e processadas para a presença e avaliação da carga parasitária. A positividade das fêmeas pós-xenodiagnóstico, corrigida com a positividade natural, variou de zero a 75,0% à DDP e esteve correlacionada, em modelo de regressão linear, com a da NC, da PCR e da qPCR, revelando r superior a 0,79. A média das cargas parasitárias dos flebotomíneos apresentou correlação positiva ($r=0,7547$; $p<0,001$) com a carga parasitária da pele e da conjuntiva do cão ($r=0,523$; $p=0,046$), entretanto, não apresentou correlação com a carga no sangue ($p=0,877$). Avaliando-se os sinais clínicos por meio da Análise de Componentes Principais (PCA), observou-se que alguns sinais estiveram relacionados com a maior carga parasitária na pele do cão e com a maior infectividade deste ao vetor.

Palavras-chave: Infectividade, *Leishmania* spp., *Lutzomyia longipalpis*, qPCR, xenodiagnóstico.

RELATIONSHIP BETWEEN PARASITE LOAD AND CLINICAL SIGNS OF DOGS NATURALLY AFFECTED BY VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY - The objective of this research was to evaluate the infectivity of dogs with different visceral leishmaniasis clinical signs, by xenodiagnosis, quantifying the parasite load on the dog 'skin samples, conjunctival swab and blood samples. For this we conducted 38 xenodiagnosis using sandflies from a visceral leishmaniasis endemic urban area and seropositive dogs. Sandflies were allowed to feed on the dog for 12 hours and, five days after it, females were dissected, subjected to parasitological evaluation by direct demonstration of the parasite (DDP) and by counting in a Neubauer chamber (NC). Sandflies DNA was extracted and amplified by conventional PCR and by real time PCR. Dogs clinical evaluation, and blood samples, conjunctival swabs and signals ear skin was taken were collected and examined and tested for the presence of kDNA *Leishmania* and to quantify the parasite load. The positivity of females 'sandflies, corrected by the natural positivity, ranged up to 75.0% and DDP was correlated in a linear regression model with NC, PCR and qPCR, revealing r greater than 0.79. The mean sandflies 'parasite load was positively correlated ($r=0.7547$, $p < 0.001$) to the dogs'parasite load of the skin and the conjunctiva ($r=0.523$, $p=0.046$) but showed no correlation to the parasite load in the blood ($p=0.877$). Evaluating the clinical signs by Principal Component Analysis (PCA), we observed that some signs were related to the higher parasite load in the dogs'skin and to the greater infectivity to the vector.

Keywords: *Leishmania* spp., *Lutzomyia longipalpis*, xenodiagnosis, qPCR.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral americana (LVA) é uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, cujo principal vetor no Brasil é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (MICHALSKY et al., 2009).

A doença está presente nas cinco regiões do Brasil, que responde por 90% dos casos que ocorrem na América Latina (ALBUQUERQUE et al., 2009). No estado de São Paulo, os primeiros casos autóctones surgiram em 1999, um ano após a detecção da doença no cão (CAMARGO-NEVES et al., 2001) e dois anos após a notificação do vetor na área urbana (COSTA et al., 1997).

Nesse estado, o agravo é igualmente um importante problema de saúde pública, pela dificuldade em se deter a expansão verificada nos últimos anos, onde foram notificados 2.204 casos até meados de 2013. Segundo Cardin et al. (2014), os casos distribuíram-se num eixo principal no sentido noroeste para sudeste, acompanhando a rodovia Marechal Rondon e o gasoduto Bolívia-Brasil, e outro, na direção norte-sul acompanhando a malha rodoviária.

O controle dessa zoonose, apesar de bem fundamentado e baseado na detecção e tratamento dos casos humanos, na aplicação de inseticidas contra o vetor e na retirada da fonte de infecção canina, não tem sido efetivo (COSTA et al., 2013). Sendo o cão principal reservatório doméstico, um dos pontos frágeis do controle é a sua eliminação, pela falta de indicadores clínicos ou laboratoriais de infectividade deste ao vetor (COSTA 2008; 2011).

A infectividade canina tem sido associada ao estado clínico do cão, havendo estudos em que se observou maior infectividade de cães sintomáticos (COURTENAY et al., 2002; MICHALSKY et al., 2007; SOARES et al., 2011), porém Laurenti et al. (2013) observaram maior poder infectante para cães assintomáticos.

Considerando-se que a infectividade dos cães depende do estágio clínico da doença, objetivou-se avaliar, por xenodiagnóstico, a infectividade de cães com diferentes sinais clínicos da doença, por meio da positividade e quantificação da carga parasitária de amostra de pele, sangue e **swab** conjuntival do cão, bem como dos vetores submetidos a xenodiagnóstico.

MATERIAL E MÉTODO

Cães

Trinta e oito cães submetidos ao xenodiagnóstico eram soropositivos e foram indicados para eutanásia, segundo orientações do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do estado de São Paulo (São Paulo, 2006), no período compreendido entre novembro de 2012 a maio de 2014.

Em cada xenodiagnóstico, que iniciou-se meia hora após o crepúsculo, um cão era mantido por 12 horas em gaiola de metal revestida por outra de tecido voil, onde um número variável de flebotomíneos fêmeas, (de 11 a 53 expostas) e similar número de machos eram introduzidos.

Finalizados os xenodiagnósticos os cães eram identificados, fotografados, avaliados clinicamente e amostras de sangue eram colhidas (em papel de filtro), por meio da punção da veia cefálica ou jugular. Após anestesia (thiopental sódico, 25-50 mg/Kg, IV) foram coletadas amostras de pele e de **swab** conjuntival bilateral e, em seguida, procedeu-se a eutanásia com cloreto de potássio (0,8mL/kg, IV), conforme legislação vigente (São Paulo, 2006).

As amostras colhidas foram processadas para a presença e quantificação de kDNA de *Leishmania* spp. no Laboratório da “University of Warwick – School of Life Sciences (Warwick – UK)”.

À avaliação clínica pesquisou-se a presença de infartamento ganglionar, perda de massa muscular, uveíte e alopecia periocular; os demais sinais clínicos foram classificados em até três cruces (+, ++, +++) dependendo do nível de sua intensidade. As alterações cutâneas foram subdivididas em dermatite, alopecia (+++) e hiperqueratose, lesões (++) , alterações oftálmicas foram subdivididas em conjuntivite (+++) e uveíte (presença/ausência), onicogribose (++) , palidez de mucosa (++) . Adicionalmente classificou-se o **score** corporal em (1=caquético; 2=magro; 3=normal; 4=obeso) de acordo com as condições gerais do animal.

Xenodiagnóstico

Flebotomíneos

Exemplares adultos (1034 fêmeas utilizadas nos experimentos e 825 fêmeas utilizadas nos controles e igual número de machos) de flebotomíneos foram capturados em área urbana do município de Araçatuba, SP, em imóveis com ambiente propício para a criação e manutenção do vetor, com auxílio de aspiradores manuais. Os exemplares foram dispostos em gaiolas de voil (20x20cm), em estufa (D.B.O – Eletro lab - 101 M), sob umidade de 86% e temperatura de 25,5°C, alimentados com solução de mel de abelha (1:1 em água destilada) e mantidos em repouso por 12 horas.

Após este período, as fêmeas de *Lu. longipalpis* utilizadas para xenodiagnóstico ficaram em jejum por 12 horas e foram triadas para verificação do conteúdo intestinal, através de observação visual. Somente as fêmeas sem

sangue e as que apresentaram até um terço do abdômen com presença de sangue participaram dos experimentos, visto o abdômen não estar preenchido completamente e a possibilidade de terminar o repasto sanguíneo: as do grupo controle permaneceram nas condições já mencionadas, sendo posteriormente dissecadas e acondicionadas em álcool isopropílico 90% ou em **RNA later** (AMBION®), a 4°C, para posterior processamento por PCR e PCR em tempo real (qPCR). Estes exemplares fêmeas foram utilizados para avaliação da infecção natural e correção da infectividade natural.

As fêmeas usadas no experimento foram recapturadas, após 12 horas de exposição ao cão, sendo mantidas nas mesmas condições pré- experimentais, por cinco dias, para a ocorrência da multiplicação e diferenciação em formas infectivas, (período da metacilogênese) (VOLF et al., 2004), até a realização da dissecação. A observação das formas flageladas foi feita por microscopia direta, sob aumento de 400 vezes (demonstração direta do parasito - DDP), posteriormente, o material foi avaliado por PCR e por qPCR.

Avaliação da infecção por *Leishmania* spp. em flebotomíneos

Após a pesquisa das formas evolutivas de ***Leishmania*** sp., feita sob estereomicroscópio, e confirmação da espécie do flebotomíneo (aumento de 400 vezes) segundo a chave taxonômica proposta por Galati (2003), a contagem do número de parasitos por flebotomíneo foi realizada em câmara de Neubauer, onde o número total de parasitos foi calculado a partir do número de parasitos visualizados em todos os nove campos multiplicado pelo fator de diluição igual a 55,56 obtido pela fórmula :
$$N = \frac{x.500}{\text{número de campos visualizados}}$$
, onde **x** = número de parasitos visualizados na câmara de Neubauer.

Nem todos exemplares submetidos aos xenodiagnósticos foram avaliados por todas as técnicas: dos 38 xenodiagnósticos realizados, 32 foram avaliados pela demonstração direta do parasito (DDP), 12 xenodiagnósticos foram também avaliados pela câmara de Neubauer, 32 pela PCR e 20 pela qPCP.

Para extração e amplificação de DNA, por PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR), seguiu-se o protocolo de Kato et al. (2007), com modificações. O material proveniente da avaliação parasitológica dos flebotomíneos foi centrifugado por 2 minutos, a 15.871g, e macerados com pistilo e pérolas de vidro (2 mm). Após descarte do sobrenadante, adicionaram-se 75 µL de solução de tampão de lise (150 mM de NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 0,1% SDS e 200 µg/mL de proteinase K - Ambion®-D10860413), seguindo-se a incubação por 6 horas, a 65°C. As amostras foram então centrifugadas por 2 min. a 15.871g e posteriormente adicionados 35 µL de água estéril misturando-se cuidadosamente, seguindo-se nova centrifugação e transferência do sobrenadante contendo o DNA para novo tubo.

A amplificação de fragmento de DNA de 120 pares de base do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp. em flebotomíneos foi realizada por PCR convencional utilizando-se o kit EmeraldAmp GT master mix (Clontech®, Takara, RR320B), 1 µL do DNA diluído 1:10 e 10 pmol/µL de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores descritos por Francino et al. (2006) e modificado por Calvo-Bado (não publicado): **forward** 5'- AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3' e **reverse**: 5'-ACCCCCAGTTTTCCGCC-3', num volume final de 12,5 µL, de acordo com as recomendações do fabricante. As condições da PCR foram 35 ciclos a 98°C por 10s, 60°C por 30s e 72°C por 30s. O resultado final foi visualizado em gel de agarose a 2%, sob luz ultravioleta.

A quantificação da carga parasitária nos flebotomíneos foi realizada por qPCR utilizando-se 900 nM dos oligonucleotídeos iniciadores já descritos, 250nM da sonda 6FAM 5' -AAAAATGGGTGCAGAAACCCCGTTC-3'-BBQ, num volume final de 15µL, contendo 2X TaqMan master mix (Applied Biosystems®).

As condições da reação foram 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 min, em termociclador 7500 Fast-Real Time PCR system (Applied Biosystems).

A quantificação absoluta de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* foi feita com base na comparação dos valores dos limiares de fase exponencial (Ct- do inglês **cycle threshold**) com os obtidos na curva padrão, construída a partir de 10 séries de diluições (0,01 a 10⁵ parasitos/mL) de DNA extraído de cultura de promastigotas de *Leishmania infantum* (ITAMP-263 DD8). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

Carga parasitária dos cães

O DNA das amostras de pele da orelha foi extraído utilizando-se o kit para tecido Chemagen (PerkinElmer®, cmg-1011), de acordo com as recomendações do fabricante, exceto para a lise, que foi realizada usando-se 50-100µL, dependendo do tamanho (espessura e peso) do tecido da orelha. O DNA foi eluído em 200 µL de tampão de eluição e armazenado a -80 °C, até processamento.

O DNA da conjuntiva foi extraído usando-se o kit de zaragatoa Chemagen (PerkinElmer®, cmg-1211) de acordo com as recomendações do fabricante, exceto para a lise de células ligadas à compressa a qual foi realizada utilizando-se 500µL de tampão de lise, por 30 min., a 56 °C. O DNA foi então eluído em 70µL de tampão de eluição e armazenado a -80 °C, até processamento.

O DNA de amostras de sangue colhidas em papel filtro Whatman®, (DNA-FTA cards), foi extraído utilizando-se o mesmo Kit Chemagen (PerkinElmer®), seguindo as instruções do fabricante, e armazenados a -20 °C.

Análise Estatística

A infectividade observada foi corrigida pela infectividade natural através da fórmula:

$$\%I_{corr} = \frac{n(+).(100 - \%c(+))}{n_{Total}}$$

onde:

$n(+)$ = número de fêmeas infectadas

n_{Total} = número total de fêmeas ao final do ensaio de xenodiagnóstico,

$$\%c(+) = \frac{n_{controle}(+)}{n_{Total(controle)}}.100$$

A correlação entre a infectividade ao vetor e a carga parasitária da pele da orelha e do tecido conjuntival (**swab** direto e esquerdo) bem como do sangue foi feita por regressão linear, assim como entre as infectividades obtidas por diferentes métodos diagnósticos.

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada com auxílio do programa Statistica 8.0, utilizando-se a presença dos 12 sinais que foram escalonados, ou seja, as intensidades foram matematicamente convertidas na faixa de -3 (ausência de sinal) até + 3 (sinal intenso).

A correlação entre o sexo e a idade dos cães e a infectividade foi feita por Teste de Mann Whitney **U**, Correlação de Spearman e Regressão Linear Simples (Bio Estat. 5,0 e Statistica 8.0).

Esta pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UNESP, câmpus de Araçatuba (processo FOA 01984-2012).

RESULTADOS

Infectividade para o vetor

Dos cães que fizeram parte dos experimentos, 22 eram fêmeas e 15 machos; a idade variou de 7 a 120 meses, sendo que a mediana foi de 48 meses, o primeiro quartil de 29 meses e o terceiro de 72 meses (o primeiro cão não teve esses dados coletados). Não foram observadas diferenças significativas entre os sexos dos animais em relação à infectividade medida por todos os métodos ($p > 0,26$ para o Teste de Mann Whitney **U**), nem para as suas idades em relação à infectividade ($p > 0,14$ para a Correlação de Spearman e $p > 0,10$ para Regressão Linear Simples).

Os 38 xenodiagnósticos realizados não puderam ser avaliados por todas as técnicas diagnósticas, assim, a positividade das fêmeas, ou seja, o percentual de fêmeas que foram infectadas em relação ao número de fêmeas analisadas por xenodiagnóstico variou de 0,0 a 75,0% nos 32 xenodiagnósticos analisados considerando-se a visualização direta do parasito (DPP). Considerando-se a contagem em câmara de Neubauer (NC) variou de 0,0 a 68,8% ($n=12$), por PCR variou de 0,0 a 77,3 ($n=32$) e, por qPCR, de 0,0 e 78% ($n=20$).

A infectividade observada por meio da PCR, da contagem em câmara de Neubauer e da qPCR foi corrigida com a infectividade natural e correlacionada com a obtida pela DPP, em modelo de regressão linear, resultando em $r = 0,9769$ para Câmara de Neubauer (NC), em $r = 0,7989$ para qPCR e em $r = 0,8293$ para PCR (Figura 01). Dados da positividade de cada xenodiagnóstico segundo a técnica utilizada no anexo 01.

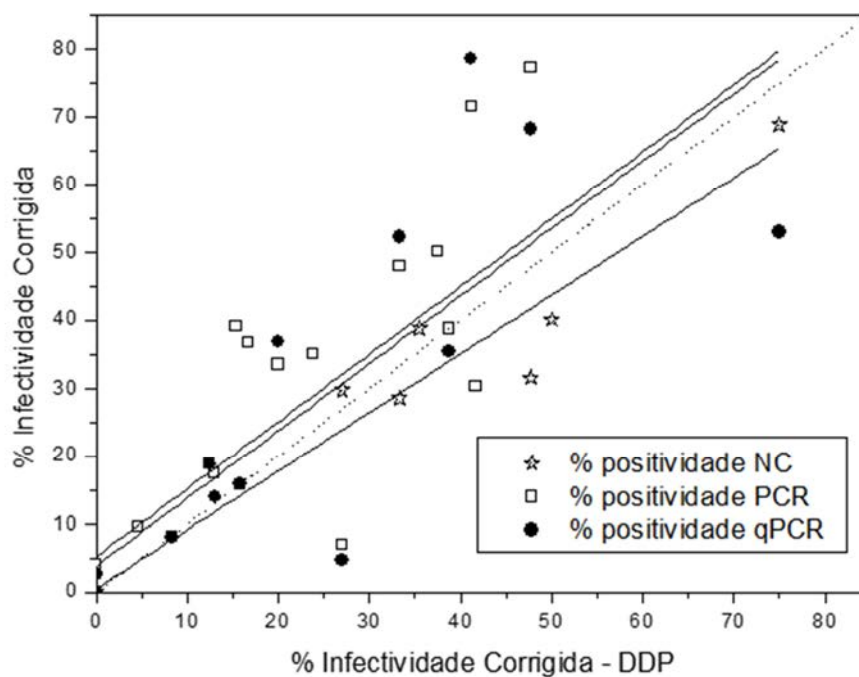


Figura 1 – Correlação entre o percentual de positividade observada pela contagem em câmara de Neubauer- NC (☆), PCR (□) e qPCR (●) e infectividade observada pela DDP.

A avaliação da carga parasitária em amostras de pele da orelha dos cães revelou que quanto maior a carga neste tecido, maior é a carga parasitária dos flebotomíneos infectados ao xenodiagnóstico. A regressão linear da médias do logaritmos da carga parasitária da pele do cão e dos flebotomíneos apresentou correlação de 0,7547, enquanto com o uso de todos os valores de logaritmo das cargas das fêmeas a correlação foi de 0,4312 (Figura 2).

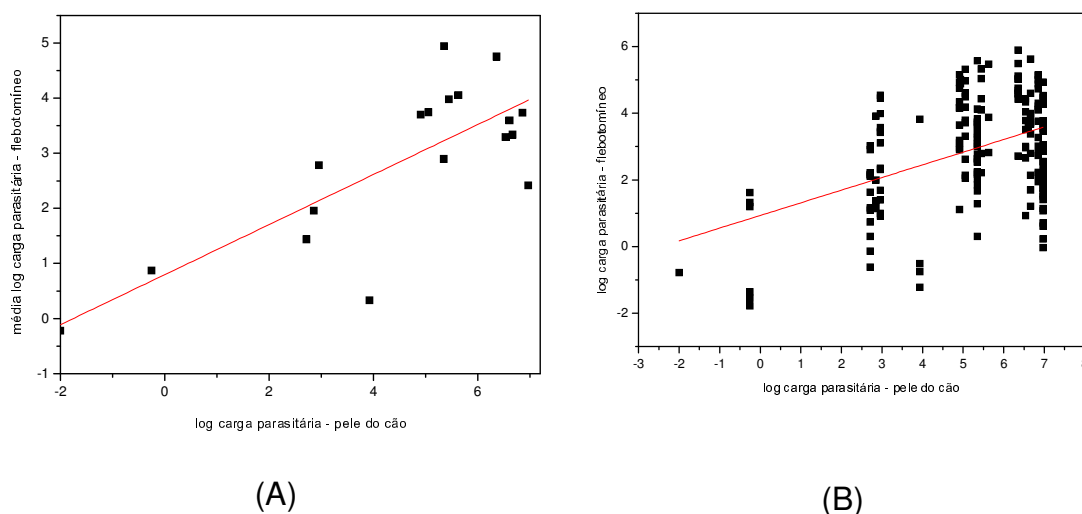


Figura 2- Correlação entre o logaritmo das cargas parasitárias de pele de cães infectados por *Leishmania* spp. e o logaritmo da carga parasitária dos flebotomíneos. (A) média dos logaritmos da carga parasitária dos flebotomíneos (B) logaritmos da carga parasitária dos flebotomíneos individualizados.

Observou-se correlação entre a carga parasitária das amostras de **swab** conjuntival direito e esquerdo ($r=0,9294$) não tendo sido observada diferença significativa entre os dois lados ($p=0,2363$). Desta forma, usaram-se apenas os resultados do **swab** direito para as análises. Observou-se correlação positiva entre a carga parasitária do **swab** conjuntival ($n=15$) e a dos flebotomíneos ($r=0,523$ e $p=0,046$), porém não houve correlação entre a carga de *Leishmania* presente no sangue ($n=19$) e a carga do protozoário no flebotomíneo ($r=0,038$ e $p=0,877$).

Aspectos clínicos e infectividade

A análise de componente principal (PCA) foi realizada visando-se identificar padrões de sinais clínicos de acordo com a carga parasitária dos cães submetidos a xenodiagnóstico, bem como com sua infectividade ao vetor. Inicialmente 36 cães foram classificados por categorias de intensidade de sinais (Tabela 1).

Tabela 1 – Percentual e número de sinais clínicos classificados por presença/ausência e/ou intensidade (0=ausência), (+), (++) e (+++) e classificação do **score** corporal: 1- caquético, 2- magro, 3- normal e 4- obeso dos cães sorologicamente positivos para *Leishmania* spp. e submetidos aos xenodiagnósticos no CCZ de Araçatuba, São Paulo.

Sinais Clínicos		Categorias: % (número)				
		0	+	++	+++	% sinais totais
	Infartamento Ganglionar	30,6(11)	69,4(25)			69,4
	Perda de massa muscular	50,0(18)	50,0(18)			50,0
	Palidez de mucosa	38,9(14)	55,6(20)	5,6(2)		61,1
	Onicogrifose	13,9 (5)	50,0 (18)	36,1(13)		86,1
Alterações cutâneas	Dermatite	41,7(15)	30,6(11)	13,9(5)	13,9(5)	58,3
	Alopecia	52,8(19)	27,8(10)	13,9(5)	5,6(2)	47,2
	Hiperqueratose	69,4(25)	25,0(9)	5,6(2)		30,6
	Lesões	36,1(13)	36,1(13)	27,8(10)		63,9
	Alopecia periocular	72,2(30)	27,8(6)			27,8
Alterações oftálmicas	Conjuntivite	41,7(15)	25,0(9)	19,4(7)	13,9(5)	58,3
	Uveíte	72,2(30)	27,8(6)			27,8
		1	2	3	4	
Score corporal		11,1 (4)	47,2(17)	38,9(14)	2,78(1)	58,3

A PCA selecionou dois componentes principais: o PC1 e o PC2. O PC1 explicou 26,86% da variância total e o PC2 16,33% (Figura 3). O PC1 foi associado a todos os sinais clínicos com os **loadings** negativos. Os valores de loading obtidos pelo PC1 de cada variável avaliada foram: dermatite (-0,86), alopecia (-0,75), hiperqueratose (-0,64), lesões (-0,62), alopecia periocular (-0,62), conjuntivite (-0,40), uveíte (-0,05), palidez de mucosa (-0,58), **score** corporal (-0,38), onicogribose (-0,26), infartamento ganglionar (-0,24) e perda de massa muscular (-0,35). O PC2, por outro lado, separou os dados em duas categorias de sinais (grupo A - **loadings** negativos e grupo B - **loadings** positivos). No grupo A (PC2-) foram englobados palidez de mucosa (-0,34), score corporal (-0,56), onicogribose (-0,68), enfartamento ganglionar (-0,48) e perda de massa muscular (-0,21) e lesões (-0,10). No grupo B (PC2+) os sinais foram dermatite (+0,18), hiperqueratose (+0,37), alopecia periocular (+0,49), conjuntivite (+0,49) e uveíte (+0,32).

Na Figura 3C são apresentadas as curvas de nível da porcentagem de infectividade para as fêmeas de flebotomíneos, obtidas por PCR convencional, em função dos escores do PC1 e do PC2. Quadrante I [PC1 (-) e PC2 (-)]; II [PC1(+) e PC2(-)]; III [PC1(-) e PC2 (+)], IV [PC1 (+) e PC2 (+)].

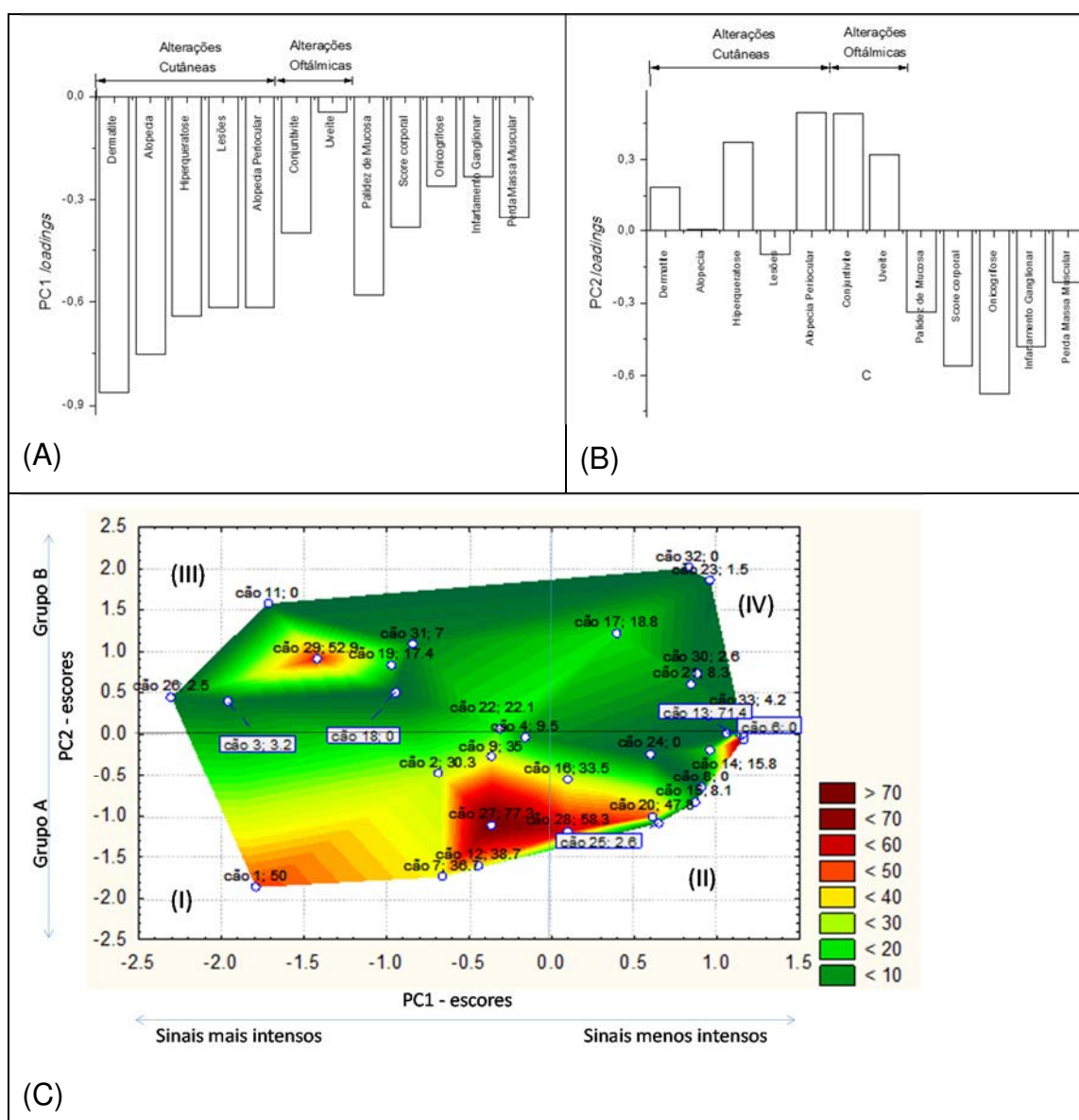


Figura 3 - Análise de componentes principais dos sinais clínicos dos cães. (A) gráfico de **loadings** de PC1, (B) gráfico de loadings de PC2. (C) Gráfico de superfície de infectividade medida pela PCR x **scores** de PC1 e PC2. Quadrante I- PC1 (-) e PC2 (-); II - PC1 (+) e PC2 (-); III PC1 (-) e PC2 (+); IV PC1 (+) e PC2 (+).

A distribuição de frequência da infectividade nos xenodiagnósticos, de acordo com o resultado da PCA, revelou um percentual acima de 30% de fêmeas infectadas no quadrante I, enquanto o quadrante IV apresentou a menor infectividade (abaixo de 20%). No quadrante III, a maioria dos xenodiagnósticos apresentou infectividade com menos de 30%, e o quadrante II revelou percentual heterogêneo (Figura 4).

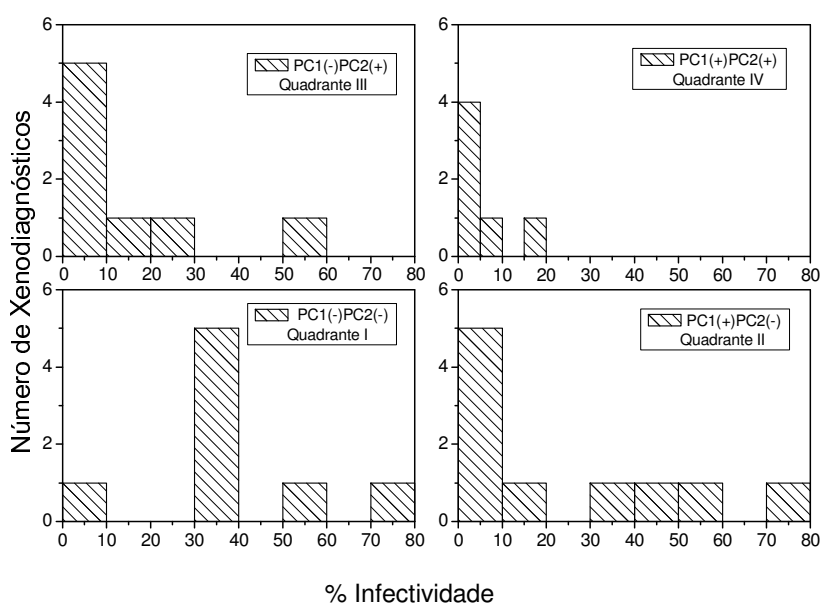


Figura 4 - Frequência do percentual de fêmeas que se infectaram durante os experimentos de xenodiagnósticos avaliadas por PCR convencional, e agrupados de acordo com resultados das análises de PCA. Quadrantes I, II, III e IV.

A PCA indicou que os cães do Quadrante I, que apresentam onicogribose, infartamento ganglionar, perda de massa muscular, lesões cutâneas, pior **score** corporal e palidez de mucosa (mais intensos que os do Quadrante II) infectaram um maior número de flebotomíneos do que os cães do Quadrante IV, que apresentaram dermatite, hiperqueratose, conjuntivite, alopecia periocular, e uveíte (menos intensos que o quadrante III).

Os xenodiagnósticos que apresentaram mais de 30% de fêmeas infectadas à PCR, foram distribuídos de acordo com a classificação proposta pela PCA (Tabela 2). Verificou-se que, no Quadrante I, a taxa de infectividade foi alta, ou seja, 88% dos xenodiagnósticos apresentaram infectividade para os flebotomíneos superior a 30%, enquanto o quadrante IV não houve infectividade acima de 30%. O grupo constituído pelo quadrante II também apresentou uma elevada taxa de infectividade (40% dos xenodiagnósticos desse grupo tiveram uma infectividade superior a 30%), e para o quadrante III em 13% dos xenodiagnósticos a infectividade das fêmeas foi superior ao valor de 30%. Portanto, o quadrante I apresentou a maior taxa de infectividade, ou seja a maioria dos cães (7/8) apresentou infectividade superior a 30%, sendo que os cães desse quadrantes apresentaram os sinais mais intensos (**loadings** negativos do PC1), associados à onicogrifose, infartamento ganglionar, perda de massa muscular, lesões cutâneas, pior score orporal e palidez de mucosa (devido ao PC2(-)).

Tabela 2- Percentagem de xenodiagnóstico com infectividade superior a 30 % em cada quadrante da PCA

Quadrante	Descrição Quadrante		% (número de xenodiagnóstico com infectividade superior a 30% / xenodiagnóstico total)
I	PC1(-)	PC2(-)	88 (7/8)
II	PC1(+)	PC2(-)	38 (4/10)
III	PC1(-)	PC2(+)	13 (1/8)
IV	PC1(+)	PC2(+)	Zero (0/6)

Klinblin et al (2008) estabeleceram valores para alta e baixa dosagem de inoculação de parasitos no camundongo (BALB/c) e relacionaram essas

diferentes cargas com maior ou menores alterações clínicas. Assim, escolhemos a dosagem de 5000 parasitos por flebotomíneo como **cut-off** para classificá-los de acordo com a capacidade infectante. O percentual médio das fêmeas infectantes pós xenodiagnóstico, de acordo com o **cut-off** estabelecido, foi de 39,0%, 37,9%, 31,9% e 46,7% para os grupos I, II, III e IV, respectivamente da PCA (Tabela 3). Considerando o mesmo **cut-off** (5.000 parasitos por flebotomíneo), calculou-se o percentual por xenodiagnóstico que são apresentadas na mesma tabela.

Tabela 3 – Distribuição do percentual médio de fêmeas infectantes por quadrante da PCA e percentual de fêmeas infectantes por xenodiagnóstico.

Quadrante	% médio de fêmeas Infectante (qPCR)*	Identificação Xenodiagnóstico	% de fêmeas Infectantes por xenodiagnóstico (qPCR)***
I	39,0%	12	90,9
		27	20,0
II	37,9%	13	45,5
		14	20,0
		15	100,0
		16	63,6
		20	50,0
		25	25,0
		28	0,0
III	31,9%	18	0,0
		21	23,1
		22	58,8
		24	0,0
		26	20,0
		29	44,4
IV	46,7%	17	33,3
		19	66,7
		23	14,3
		30	0,0
		31	0,0

* percentual médio de flebotomíneos infectantes por quadrante (fêmeas com carga superior a 5.000 parasitos por flebotomíneo).

**percentual médio de flebotomíneos infectantes por xenodiagnóstico (fêmeas com carga superior a 5.000 parasitos por flebotomíneo).

Ao testar a PCA dos sinais clínicos e as médias das cargas parasitárias das amostras de pele, de **swab** conjuntival, de sangue e dos flebotomíneos (Figura 4) verificou-se que, à exceção do sangue (Figura 4C), para os demais, ocorreram padrões de distribuição.

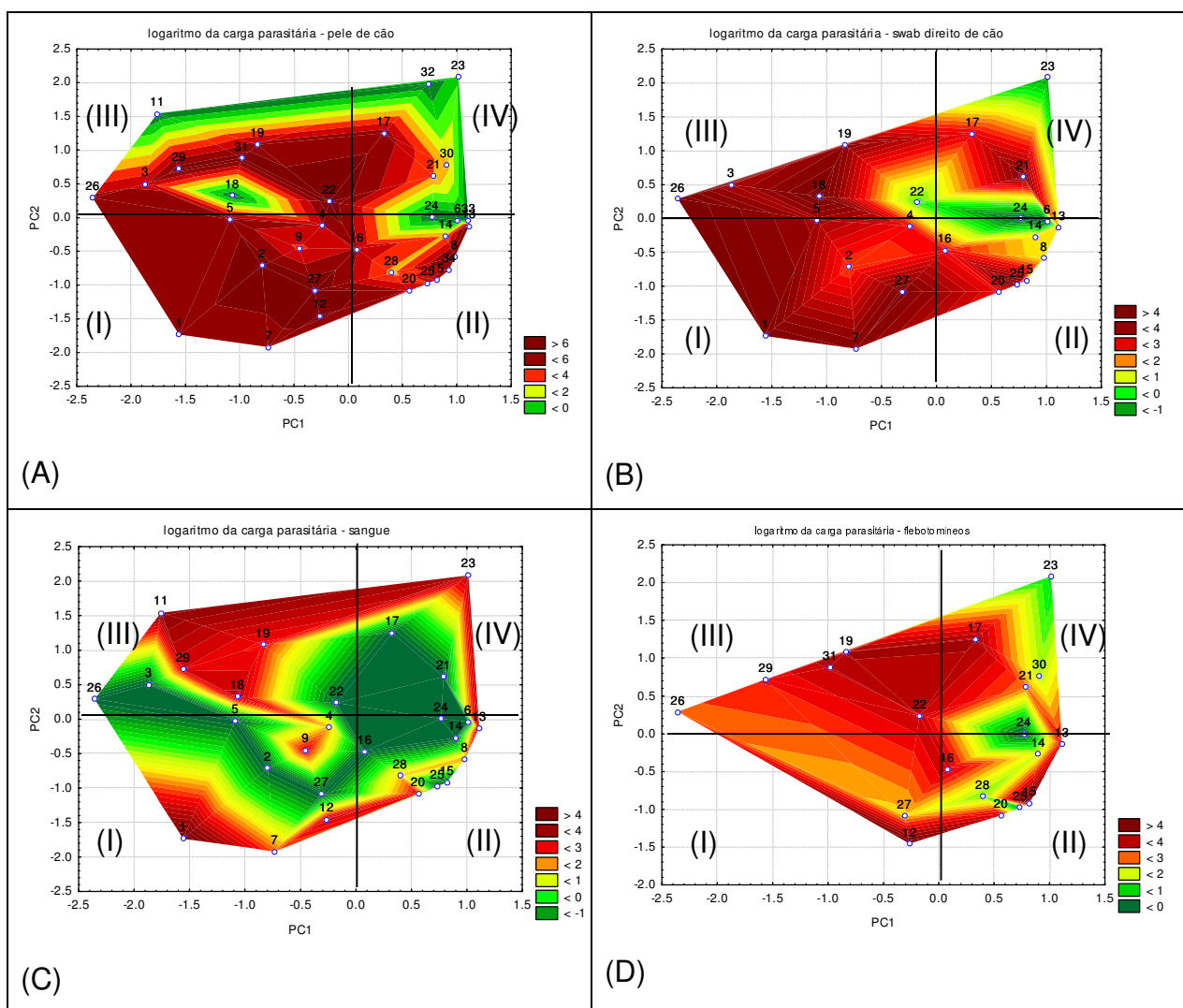


Figura 4 - Gráfico de superfície da Análise de Componentes Principais (PCA) dos sinais clínicos dos cães submetidos ao xenodiagnóstico e carga parasitária de *Leishmania spp.* a qPCR x escores de PC1 e PC2. Carga parasitária em pele de cães (A); em **swab** conjuntival de cães (B); em sangue de cães (C) e em fêmea de *Lu. longipalpis* (D).

Portanto, a PCA foi capaz de agrupar os mais sintomáticos com os de maior positividade e carga, sendo coincidentes no quadrante I, enquanto os com menos sinais e os de menor positividade, no quadrante IV.

Para as cargas de pele e de **swab** conjuntival há uma distribuição tal que os maiores valores se encontraram no quadrante I e os menores no quadrante IV. Em relação ao **swab** conjuntival a carga parasitária máxima ficou abaixo e 620 parasitos por amostra no quadrante IV, e nos demais quadrantes a carga máxima ficou acima de 10.000 parasitos por amostra. Para a média das cargas nos flebotomíneos verificou-se que nos quadrantes II e IV os valores foram menores que nos quadrantes I e III. Isso significa que apenas o PC1 explicou o comportamento dessa variação de carga e pode-se ver que quanto maior o número de sinais e maior intensidade, maior a média de carga nos flebotomíneos nesses dois quadrantes.

DISCUSSÃO

A infectividade aos vetores de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral e com diferentes sinais da doença foi avaliada por meio da quantificação da carga parasitária de amostra de pele, **swab** conjuntival e sangue bem como dos vetores submetidos a xenodiagnóstico.

O percentual de flebotomíneos infectados apresentou grande variação entre os xenodiagnósticos (de zero a 70%), em todas as técnicas diagnósticas utilizadas, possivelmente pela diversidade de interação entre o parasito e o vetor, bem como pelo processo de fisiologia da digestão neste último (SECUNDINO et al., 2011).

Quando se comparou as similaridades entre as infectividades dos flebotomíneos obtidas pelas diferentes técnicas, verificou-se ótima correlação

entre a visualização direta (DPP) e as demais, oferecendo, portanto, alternativas para o uso de outras técnicas, não só em xenodiagnósticos bem como em inquéritos entomológicos. Particularmente, as técnicas de biologia molecular podem ser vantajosas por serem automatizadas, oferecem a vantagem de processamento de um número grande de amostras em menor tempo, bem como por serem quantitativas, no caso da qPCR (RANASINGHE et al., 2008).

Neste estudo, observamos correlação positiva ($r=0,7547$) entre a carga parasitária da pele dos cães e a carga parasitária dos flebotomíneos. Resultado semelhante foi observado em estudo realizado por Amorim et al. (2011) cujos cães com menor carga parasitária na pele foram os menos infectantes aos flebotomíneos, à visualização direta do parasito nos flebotomíneos. Por outro lado, Kimblin et al. (2008) referem-se ao fato de que, após o repasto infectante e durante o processo da metaciclogênese, pode ocorrer variação entre a carga parasitária no hospedeiro e a presente no flebótomo infectado, portanto nessa avaliação não podemos desconsiderar essas observações.

Apesar da heterogeneidade da população canina estudada a análise de Componentes Principais (PCA) identificou dois grupos distintos (PC1 e PC2), quando se considerou o padrão de sinais clínicos dos cães. Assim, em 88% dos xenodiagnósticos do quadrante I, observou-se infectividade superior a 30%, sugerindo que a combinação dos sinais onicogrifose, infartamento ganglionar, perda muscular, lesões, palidez de mucosa e **score** corporal baixo favoreceu a alta infectividade.

Em contrapartida, não se observou nenhum xenodiagnóstico com infectividade superior a 30% para os flebotomíneos expostos ao grupo de cães com menor número de sinais clínicos (PC1 com **loadings** positivos) ou com sinais mais acentuados de dermatite, hiperqueratose, alopecia peri-ocular, conjuntivite e uveíte (grupo B do PC2+). Esse resultado é interessante uma vez que, usualmente são estudados os resultados de infectividade entre os cães sintomáticos e assintomáticos (TRAVI et al., 2001; QUINNELL; COURTENAY,

2009). Neste trabalho foi possível distinguir grupos de sinais clínicos mais importantes para a infectividade entre os sintomáticos, através do PCA.

Porém, quando avaliamos, nos quadrantes da PCA, a distribuição do percentual das fêmeas com alta carga de parasitos, não foi concordante com a positividade obtida nos xenodiagnósticos (Tabela 2). Talvez por conta da heterogeneidade nas cargas das fêmeas (a média das cargas das fêmeas por xenodiagnóstico).

Werneck (2008) discute a heterogeneidade da doença como consequência do processo de sua adaptação à área urbana, sua distribuição e à complexidade de todos os fatores envolvidos. É um grande desafio encontrar um padrão na sintomatologia dos cães doentes e associar com a infectividade principalmente em área endêmica onde a dificuldade da manutenção das atividades de vigilância e controle são tão marcantes e por consequência disso vê-se essa complexidade também na população canina como um todo.

Observou-se entre os cães um padrão de sinais clínicos que se relaciona com a maior infectividade obtida pelos flebotomíneos, bem como com a carga parasitária da pele e **swab** conjuntival, mas não do sangue dos cães avaliados. Também foi possível verificar que quanto maior a carga parasitária na pele e no **swab** dos cães maior foi a carga parasitária nos flebotomíneos, porém, há uma grande variação no número de parasitos entre os flebotomíneos alimentados num mesmo cão, indicando que aspectos da interação parasito-vetor-reservatório devam ser melhor investigados.

AGRADECIMENTOS

Bolsa recebida da CAPES processo Nº 2062/13-5, aos funcionários de Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, Laboratório de Warwick, Laboratório de

Bioquímica e Biologia Molecular da UNESP de Araçatuba, Superintendência de Controle de Endemias.

REFERÊNCIAS

ADLER, S.; THEODOR, O. Skin infection in canine visceral leishmaniasis. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1179-1179, 1931.

ALBUQUERQUE, P. L.; SILVA JUNIOR, G. B.; FREIRE, C. C.; OLIVEIRA, S. B.; ALMEIDA, D. M.; SILVA, H. F.; CAVALCANTE MDO, S.; SOUSA ADE, Q. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceara, Brazil. **Revista Panamericana Salude Publica**, v. 26, p. 330-333, 2009.

AMORIM, I.F.G.; SILVA, S.M.; FIGUEIREDO, M.M.; MOURA, E,P.; CASTRO, R.S.; LIMA, T.K.S.; GONTIJO, N.F.; MICHALSCK, M.S.M.; GOLLOB, K.J.; TEFURI, W.L. Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis. **PLOS ONE**, 6 e27679.

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

CAMARGO-NEVES V.L.F; RODAS L.A.C; POLETTO D.W; LAGE, L, SPÍNOLA, R.M; CRUZ, O; CARVALHO, M.S. A Utilização da análise espacial na transmissão da leishmaniose visceral americana em Araçatuba. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34 (Suplemento), p.184, 2001.

CARDIM, M.F.M.; RODAS, A.C.L.; DIBO, M.R.; GUIRADO, M.M.; OLIVEIRA, A.M.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Introdução e expansão da leishmaniose visceral americana em humanos no estado de São Paulo 1999-2011. **Revista Saúde Pública**, v.47, n.4, p. 691-700, 2013.

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

COSTA, D.N.C.C; CODEÇO, C., SILVA, M.A; WERNECK G.L. Culling Dogs in Scenarios of Imperfect Control: Realistic Impact on the Prevalence of Canine Visceral Leishmaniasis. **Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.8, p. e2355- e2355, 2013.

COSTA I.P, CASANOVA C, RODAS L.A.C e GALATI E.A.B. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.31, p. 632-633, 1997.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314-20, 2002.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, **Microbiology and Infectious Diseases** , v.27, p. 305–318, 2004.

DUJARDIN, J.C.; CAMPINO, L.; CAÑAVATE, C.; DEDET, J.P.;, Gradoni L.; SOTERIA DOU, K.; Mazeris, A.; Ozbel, Y.; Boelaert, M. Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 1014-1018, 2008.

FRANCINO, O.; A.; ALTET, L. A.; SANCHEZ-ROBERTA.; E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGU, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SANCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis. **Veterinary Parasitology**, v. 30; p. 137(3-4):214-21, 2006.

GALATI, E.A.B. Morfologia, Terminologia de Adultos e Identificação dos Táxons da América. In: Rangel EF, Lainson R (Org.) **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Fiocruzp.53-175, 2003.

KATO, H.; UEZATO, H.; GOMEZ, E. A.; TERAYAMA, Y.; CALVOPÍÑA, M.; IWATA, H.; HASHIGUCHI, Y.; et al. Establishment of a Mass Screening Method of Sand Fly Vectors for Leishmania Infection by Molecular Biological Methods. **American Journal Medical Hygiene**, v.77, n. 2, p. 324-329, 2007.

KIMBLIN, K.; PETERS, N.; DEBRABANT, A.; SECUNDINO, N.; EGEN, J.; LAWYER, P.; et al. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. **Medical Science**, v.105, n.29, p. 10125–10130, 2008.

LAINSON. R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p. 811-827, 2005.

LAURENTI, M.D.; ROSSI, C.N.; MATTA, V.L.R.; TOMOKANE, T.Y.; CORBETT, C.E.P.; SECUNDINO, N.F.C.; PIMENTA, P.F.P.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v.196, n.3-4, p. 296-300, 2013.

MICHALSKY, E.M.E.; ROCHA, M.F.; LIMA, A.C.V.M.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; PIRES, M.Q.; OLIVEIRA, F.S.; et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**, v.147, p.67-76, 2007.

MICHALSKY, E.M.; FORTES-DIAS, C.L.; FRANÇA-SILVA, J.C.; ROCHA, M.F.; BARATA, R.A.; DIAS, E.S. Association of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an área of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, n. 8, p. 1191-1193, 2009.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRES, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 88, n. 4, p. 491-3,

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915-34, Dec 2009.

RANASINGHE, S.; ROGERS, E.M.; HAMILTON, C.G.J.; BATES, A.P.; MAINGON, C.D.R. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, p. 875-882. 2008.

SÃO PAULO, Secretaria de Estado da Saúde Coordenadoria de Controle de Doenças. Programa de Controle de Populações de Cães e Gatos do Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista** – v.3 Suplemento 5, 2006.

SECUNDINO, N.F.C.; FREITAS, V.C.; PIMENTA, P.F.P. A Biologia da Interação dos Flebotomíneos com a *Leishmania*. In: Barral A e Costa J. **Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas**, Salvador, BA: Editora CYTED/CNPQ: p. 90-101, 2011.

SOARES, M.R.; MENDONÇA, I.L.; BONFIM, J.M.; RODRIGUES, J.A.; WERNECK, G.L.; COSTA, C.H. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Tropica**, v.117, n.1, p. 6-9, 2011.

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 3-4, p. 119-24, Mar-Apr 2001.

WERNECK, G.L.; PEREIRA, T.J.C.F.; FARIAS, G.C., SILVA, F.O., CHAVES, F.C., GOUVÊA, M.V., et al. (2008) Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí,

Brasil: resultados do inquérito inicial – 2004. **Epidemiologia Serviços de Saúde**, v. 17, n.2, p.87-96, 2008.

VOLF, P.; HAJMOVA, M.; SADLOVA, J. VOTYPKA, J. Blocked stomadeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. **International Journal of Parasitology**, v.34, p.1221-1227, 2004

APÊNDICE

Resultado da infectividade dos xenodiagnósticos e controle obtidos pelos diferentes métodos diagnósticos (DDP, NC, PCR e qPCR) e carga parasitária de amostras de pele da orelha, sangue e swab conjuntival de cães e de valores médios de flebotomíneos.

Xenodiagnóstico	% DDP	% NC	% PCR	% qPCR	% C-DDP	% C-PCR	% C-qPCR	Log (carga parasitária)			
								pele de orelha	sangue	Swab conjuntival	Flebotomíneos (valores médios)
1	37,5	NR	50,0	NR	0,0	0,0	NR	5.50	4.82	4.49	NR
2	41,7	NR	30,3	NR	0,0	33,3	NR	6.65	ND	2.23	NR
3	0,0	NR	3,2	NR	0,0	33,3	NR	4.84	ND	3.49	NR
4	4,5	NR	9,5	NR	0,0	0,0	NR	4.95	1.65	2.63	NR
5	15,4	NR	39,1	NR	0,0	0,0	NR	5.66	ND	3.65	NR
6	0,0	NR	0,0	NR	0,0	33,3	NR	ND	ND	ND	NR
7	16,7	NR	36,7	NR	0,0	0,0	NR	5.55	2.19	4.22	NR
8	0,0	NR	0,0	NR	0,0	33,3	NR	6.58	1.86	1.24	NR
9	23,8	NR	35,0	NR	0,0	0,0	NR	3.80	2.90	NR	NR
11	0,0	NR	0,0	NR	0,0	50,0	NR	ND	4.09	NR	NR
12	38,7	NR	38,7	35,4	0,0	00	8,6	6.36	3.15	NR	NR
13	41,2	NR	71,4	78,0	0,0	0,0	0,0	6.67	3.37	1.55	13.73
14	15,8	NR	15,8	15,8	0,0	0,0	0,0	2.86	ND	1.30	4.57
15	8,3	NR	8,1	8,1	0,0	2,9	2,9	5.36	ND	0.02	3.02
16	20,0	NR	33,5	36,8	0,0	2,9	2,9	5.06	ND	2.63	4.94
17	12,5	NR	18,8	18,8	0,0	0,0	0,0	5.63	ND	2.79	4.56
18	0,0	NR	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ND	ND	ND	5.01
19	13,0	NR	17,4	13,9	0,0	0,0	8,5	5.45	3.33	4.67	NR
20	33,3	NR	47,8	52,2	0,0	0,0	0,0	4.91	2.66	3.99	4.73
21	NR	NR	8,3	33,3	NR	0,0	0,0	2.96	2.86	2.70	4.45
22	NR	NR	22,1	59,3	NR	14,7	5,9	6.86	ND	4.14	3.62
23	NR	NR	1,5	12,9	NR	37,5	20,8	-0.25	ND	0.02	4.42
24	NR	NR	0,0	15,8	NR	37,5	20,8	ND	3.56	-1.20	5.53

25	NR	NR	2,6	10,26	NR	0,0	0,0	3.93	ND	ND	-0.17
26	NR	NR	2,5	75,00	NR	0,0	0,0	5.35	ND	4.38	2.70
27	47,7	31,6	77,3	68,2	0,0	0,0	0,0	6.97	ND	4.73	4.15
28	12,5	8,3	58,3	56,5	0,0	0,0	3,2	2.72	ND	4.36	3.73
29	75,0	68,8	52,9	52,9	0,0	0,0	0,0	6.54	1.57	NR	13.46
30	0,0	NR	2,6	2,6	0,0	0,0	0,0	2.34	2.99	NR	3.90
31	27,0	29,7	7,0	4,7	0,0	0,0	0,0	6.61	ND	NR	1.44
32	0,0	0,0	0,0	NR	0,0	0,0	NR	ND	ND	NR	3.63
33	0,0	0,0	4,2	NR	0,0	0,0	NR	ND	ND	NR	NR
34	33,3	28,6	NR	NR	0,0	NR	NR	5.18	NR	NR	NR
35	0,0	0,0	NR	NR	0,0	NR	NR	ND	ND	ND	NR
36	0,0	0,0	NR	NR	0,0	NR	NR	ND	ND	ND	NR
37	35,5	38,7	NR	NR	0,0	NR	NR	ND	ND	ND	NR
38	50,0	40,0	NR	NR	0,0	NR	NR	ND	ND	ND	NR
39	0,0	0,0	NR	NR	0,0	NR	NR	ND	ND	ND	NR

% DDP – percentual demonstraco direta do parasito % C-DDP – percentual DDP no Controle
 % C-PCR – percentual PCR no Controle

% NC – percentual da cmara de Neubauer

% C-qPCR – percentual da qPCR no Controle

% PCR – percentual da Reaco em cadeia pela polimerase (PCR)

ND – no detectado

NR- no realizado

% qPCR – percentual da PCR em tempo real (qPCR)